

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; NOBORU ARIYAMA, Niigata; AKIJI FUJITA, Tokyo; KIKO GOTO, Kyoto; KO ICHIHARA, Osaka; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Tokyo; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; HAZIME MASAMUNE, Sendai; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; SHIGEO SUZUKI, Kagoshima; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; SHIGERU TODA, Hoten; MASAJI TOMITA, Kobe; SENJI UCHINO, Kyoto; TOYOO UCHINO, Nagasaki,

QP
501
J67

EDITED BY

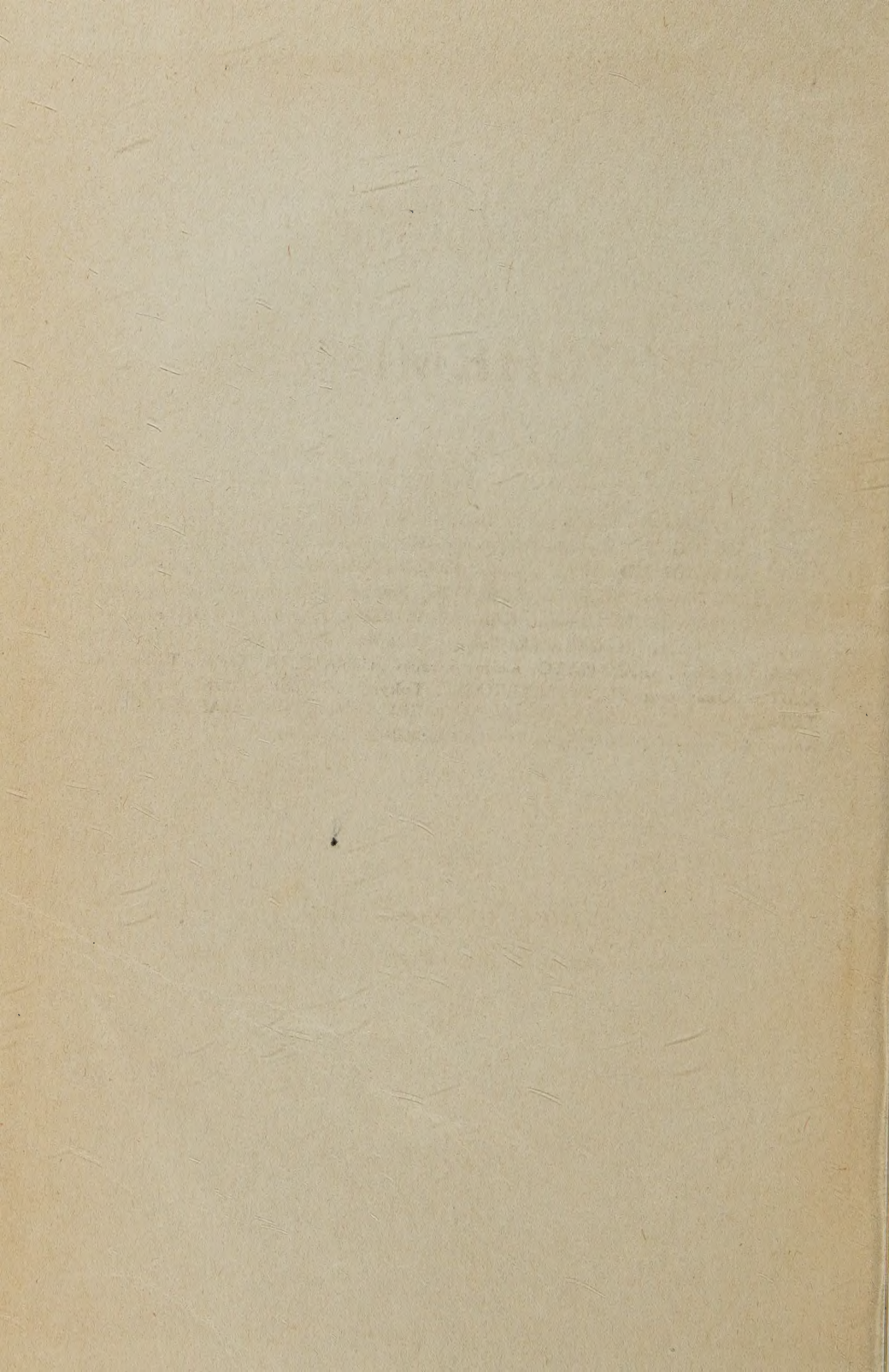
SAMURO KAKIUCHI

Professor emer. in the Tokyo Imperial University

VOLUME 36

TOKYO

1944



THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; NOBORU ARIYAMA, Niigata; AKIJI FUJITA, Tokyo; KIKO GOTO, Kyoto; KO ICHIHARA, Osaka; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Tokyo; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; HAZIME MASAMUNE, Sendai; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; SHIGEO SUZUKI, Kagoshima; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; SHIGERU TODA, Hoten; MASAJI TOMITA, Kobe; SENJI UCHINO, Kyoto; TOYOO UCHINO, Nagasaki.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor emer. in the Tokyo Imperial University

VOLUME 36

TOKYO

1944

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

COPYRIGHT 1944

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

TAMURO KAKIUCHI

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

TOKYO

1944

外字生化學雜誌終刊の辭

大正十一年一月を以て第一卷一號を發刊した本誌も愈々本第三十六卷を以て終刊することとした。其二十有二年餘の間に本誌に寄せられた有形無形の御協力に對し各位に深く感謝を捧げるものである。思へば大正七年恩師隈川宗雄先生御捐館の後を受けて歸朝 勿々 東京帝國大學に生化學講座を擔當することになった時我國の生化學を眞に發達せしめるには専門家の少い國內のみで研究發表を行つて井中の蛙となる處を除くべきで、夫には外字の専門雜誌を發刊し諸外國の多數の専門家の意見を充分に敲く必要があることを痛感した。勿論吾人が研究の結果を書くには獨、英、佛等の國語よりも邦語を用ゐた方が容易で且つ誤りの少ないことは明瞭であり、又單に諸外國語で綴ることが學者の様に心得て居る間違つた考の研究者があることも知つて居つた。夫にも拘らず敢て外字生化學雜誌を出すことにしたのは外國の諸學者が日本語を習つて迄も本邦生化學者の論文を讀まなければならぬ迄に本邦生化學の準位を高めるには、先づ初めに本邦學者の研究結果を外國研究者環視下の壇上で琢磨する必要があるからであつた。斯くて大正十一年一月に第一卷一號を創刊してから以來二十年 苟しくも眞摯な本邦生化學の論著は此外字生化學雜誌上で諸外國研究者の批判を俟つべしとの信條の下に只管本誌の使命遂行に専念して來たのであつたが、昭和十六年十二月八日大東亞戰爭の開始と共に本誌續行の意義は全く失はれたのであつた。國內の研究者のみにしか見られない論文は毫も外國語で書かれる必要はない。仍つて直ちに本誌終刊の決意を寄稿者に告げたのであつたが多年本誌上で論文を發表されて居つた多くの研究

者は本誌の中絶を遺憾とすると慙へられた。そこで戦争期間中に採るべき方策を考へても見たが矢張創刊當初の目的の意義を失つた雑誌の刊行は斷然中止することとし、今迄受領して残つて居つた寄稿論文を第三十六卷に收めて茲に本誌を終刊する。重ねて二十有二年間本誌に寄せられた有形無形の御協力に對して各位に深く感謝を捧げる次第である。

昭和十九年四月

柿 内 三 郎 識

CONTENTS TO VOLUME 36

Page

ARA, Kiyoshi. Über die Verwertung der Fettsäuren in der Leber und dem Muskel beim Hungern.	1
MATUBARA, Kijiro. Über den Gehalt der Gewebe an verschiedenen ungesättigten Fettsäuren im Fett und Phosphatid bei Normal- sowie Fettdiät.	17
OYAMADA, Yoshio. Die Mikrobestimmungsmethode des Histidins im Harn.	43
KATAOKA, Yosimi. Über den Bildungsmechanismus der Chenodesoxycholsäure im Organismus. IV. Über das Schicksal der 3-Oxy- Δ^7 -Cholensäure im Kaninchen- und Meerschweinchenorganismus.	55
V. Über das Schicksal der 3.7-Dioxy-12-ketocholansäure im Kaninchenorganismus.	61
OKASAKI, Yasuya. Über die Gallensäuren von Wassersalamandern. I. Über die Gallensäure und Steroide in der Galle des Wassersalamanders (<i>Diemyctylus Pyrrhogaster</i>).	65
II. Über die Synthese von Homocholan $C_{26}H_{44}$ und Bisorstereocholan $C_{26}H_{46}$ und Isomocholan aus Tetraoxyisomocholan aus der Galle von Wassersalamandern.	77
OKASAKI, Yasuya. Über die Extraktivstoffe der Leber von Wassersalamandern (<i>Diemyctylus pyrrhogaster</i>) im Winterschlaf.	85
SUGAI, Kikuo. Studies on protease. VI. The effect of the addition of various sualts on the tryptic activity.	95
AJISAKA, Masanobu. Über die Verteilung des Kryptoxanthins in pflanzlichen Geweben. I.	101
NOGUCHI, Shunji. Über die lezithinspaltenden Fermente.	113
NAITO, Yosinori. Biochemical studies on <i>d</i> -ribose, with special reference to the mechanism of absorption of sugars from intestinal tract.	131
KANEMITU, Tutomu u. Kanzi IWAKI. Über den Bildungsmechanismus der Chenodesoxycholsäure im Organismus. VI. Über das Schicksal der 3.7-Dioxy-12-ketocholansäure sowie der 3.7.12-Triketocholansäure im Meerschweinchenorganismus.	163
MATUMOTO, Kenzi. Synthese der β -3- α -Dioxy-allocholansäure und der β -3- α -12-Dioxy-cholansäure	173
MATUMOTO, Kenzi. Über die Synthese der β -Allodesoxycholsäure aus Cholsäure.	183
IWAKAWA, Yosinobu. Studies on the pasteur reaction in muscle.	191
OYAMADA, Yoshio. Der enzymatische Abbau der Histidins.	227
NAKAMURA, Shinji. Über die Spezifität der Arginase.	243
AJISAKA, Masanobu. Über die Verteilung des Kryptoxanthins in pflanzlichen Geweben. II.	263
KENDO, Kazuo. Über die Konstitution des Ophidins, eines N-Haltigen Extraktivstoffe der Schlangemuskel.	265

MOTOMURA, Shizuka. Über eine gärbeschleunigende Wirkung der Zahnpulpa.	277
MOTOMURA, Shizuka. Über den Einfluss des Carnosins und Ophidins auf die alkoholischen Gärung.	283
TANAKA, Hiroshi. Chemie der Meerschildkröten. I. Über die N-haltigen Extraktivstoffe der Muskeln von Meerschildkröten.	289
II. Über die Fermente der Meerschildkrötenorgane.	301
III. Chemische Untersuchungen des Harns von <i>Chelonia japonica</i> Thumb.	313
MARUSHIMA, Yasushi. Chemische Untersuchungen der Schmerlen. (<i>Misgurnus Anguillicandatus</i> Cantor).	317
MARUSHIMA, Yasushi. Chemie des Malariaharns.	329
IMAMURA, Hiroyuki und Shun WAKESHIMA. Über das Auftreten der Milchsäure im Harn nach dem Kardiazolkampf.	335
TOMITA, Masaji und Toshio TANAKA. Über den respiratorischen Stoffwechsel beim Embryo der Reptilien.	337
TOMITA, Masaji und Tosio TANAKA. Verwirklichung der phytochemischen Reduktion von Trimethylaminoxid.	345
YOSIDA, Tatuo und Senden FUKUYAMA. Über die im Tierkörper stattfindenden Veränderungen der an N substituierten Aminosäuren. 8. Mitteilung: Über die Demethylase II. Ihre Verteilung.	349
YOSIDA, Tatuo. 9. Mitteilung: Über die Demethylase III. Ihre Eigenschaften und Komponenten.	355
SHINKAI, Keishi. Über die Zuckerbilder der Haut bei normalen und pathologischem Stoffwechsel.	369
SAKAI, Tooru. Über die Gewebeproteolyse. II. Mitteilung: Über die ereptasefreie Katheptase-Wirkung und die katheptische Aeyldipeptidase-Wirkung.	383
SUZUKI, Hiroshi. Biochemical studies on carbohydrates. LXXX. On neutral polysaccharides of glycoproteins. A supplementary note of the LIX and LXVI informations.	395
KOBAYASI, Tetu. Biochemical studies on carbohydrates. LXXXI. Chondrosin. Third Report: On so-called Chondridin.	399
TAKEDA, Yoshiharu, Tatuo OHTA und Minoru SATO. Studien über das Endotoxin von <i>Calmonella</i> Typhi. I. Mitteilung: Die Isolierung der antigenen und hoch toxischen Substanz aus <i>Salmonella typhi</i> .	407
TAKEDA, Yoshiharu, Tatuo OHTA und Yusen SEN. Studien über das Endotoxin von <i>Bacillus Dysenteriae</i> Shiga. I. Mitteilung: Die Isolierung der toxischen und antigenen Substanz von <i>Bacillus dysenteriae</i> Shiga.	419
SAKAI, Tooru. Über die Gewebeproteolyse. III. Mitteilung: Über die katheptische Peptonspaltung.	427
IV. Mitteilung: Unterscheidung der Katheptischen Peptonasewirkung von der Proteinasewirkung.	443
KAWAHARADA, Masamiti. Über die Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes des Hundes. I. Mitteilung: Säure- und Säure-	

Cystein-Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.	457
II. Mitteilung: Beiträge zur Kenntnis der Kinase-Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.	485
III. Mitteilung: Die Wirkung des Darmsaftes auf die Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.	509
IV. Mitteilung: Die Wirkung der Gewebemazeration auf die Aktivierung des Pankreassaftes.	521
TAKEDA, Yoshiharu und Tatsu OHTA. Versuch zum Ozonabbau des -Leproteins.	535
IUTI, I. Über das Verhalten verschiedener Kohlenhydrate der Organe und Gewebe im Hungerzustand und während des Winterschlafs.	539



Digitized by the Internet Archive
in 2024

ÜBER DIE VERWERTUNG DER FETTSÄUREN IN DER LEBER UND DEM MUSKEL BEIM HUNGERN.

VON

KIYOSHI ARA.

(Aus dem mediz.-chem. Institut der Keio-Universität, Tokyo.
Vorstand: Prof. Y. Sueyoshi.)

(Eingegangen am 2. Februar 1942)

I. EINLEITUNG.

Jost und Sorg (1932) haben angeführt, dass bei Ausbrütung des Hühnereis, parallel mit der Abnahme des darin befindlichen Phosphatides, die Jodzahl der Fettsäure kleiner wird und deswegen das ungesättigte Fettsäure enthaltene Phosphatid dabei mehr als das gesättigte Fettsäure enthaltene aufgebraucht wird.

Koyama (1937) hat auf Grund der Tatsache, dass beim Hungern der Maus die Jodzahl der Fett-Fettsäure in der Leber grösser und die der Phosphatid-Fettsäure kleiner wird, behauptet, dass dabei die gesättigte Fettsäure des Fettes und die ungesättigte Fettsäure des Phosphatides in reichlicher Menge benutzt werden.

Jedoch gelangten kürzlich Hodge und Mitarbeitern (1941) in Versuchen an Mäusen zu dem Ergebnis, dass beim Hungern die Fettsäure mit einer Jodzahl von etwa 80 verbrennt und dabei nicht die andere Fettsäure selektiert wird.

Ich habe die vorliegende Untersuchung vorgenommen, um durch Versuche an Tieren, welche mit verschiedenen Arten von Fett gefüttert wurden, die Ergebnisse obiger Forscher noch weiter zu klären.

II. UNTERSUCHUNGSMETHODE UND MATERIAL.

Als Versuchstiere wurden Ratten benutzt. Der wie folgt zusammengesetzten Basaldiät wurden als Standardfett Olivenöl und als das die hoch ungesättigten Fettsäuren enthaltende Fett Leinöl

(Jodzahl 185) und als das aus gesättigten Fettsäuren aufgebauten Fett Kokosöl (Jodzahl 8) je in 10%-Menge zugesetzt.

Basaldiät

Stärke	70 g
Kasein	20 g
Salz (McCollum)	4 g
Oryzanin (Vitamin B-Komplex)	2 g
Biosterin (Vitamin A u. D) ein wenig.	

Die Trennung der Fett-Fettsäure und Phosphatid-Fettsäure des Gewebes wurde nach Koyamascher Methode (1937) vorgenommen und die Jodzahl nach Wijsscher Mikromethode ermittelt.

III. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE.

Versuch I.

In diesem Versuche habe ich als zu untersuchendes Fett Olivenöl benutzt.

Die Ermittlung der Menge der Fettsäure im Fett und Phosphatid und der Jodzahl der Fettsäure in der Leber der 10 Tage lang gefütterten Ratten ergab die in Tabelle I A u. B angegebenen Daten.

Nach den Ergebnissen in Tabelle I beträgt bei Olivenöldiät die Menge der Fett-Fettsäure der Leber durchschnittlich 1.11% und die Jodzahl 87.9, die Menge der Phosphatid-Fettsäure durch-

TABELLE I(A) Leber.

Tier-Nr.	Fett-Fettsäure		Phosphatid-Fettsäure	
	%	Jodzahl	%	Jodzahl
1	0,87	93,1	2,13	146,4
2	0,75	90,3	2,12	147,3
3	1,03	86,1	2,11	135,2
4	1,39	85,6	1,99	144,1
5	1,53	84,2	1,92	141,5
Mittel	1,11	87,9	2,05	142,9

TABELLE I(B) Muskel.

Tier-Nr.	Fett-Fettsäure		Phosphatid-Fettsäure	
	%	Jodzahl	%	Jodzahl
1	2,45	83,1	0,70	144,3
2	1,04	83,9	0,67	141,2
3	1,09	87,2	0,62	144,1
4	0,98	85,1	0,67	150,8
5	1,83	84,2	0,75	146,2
Mittel	1,48	84,7	0,68	145,3

schnittlich 2.05% und die Jodzahl 142.9. Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Menge der Phosphatid-Fettsäure in der Leber weitaus grösser als die der Fett-Fettsäure ist; das Verhältnis ist Fett-Fettsäure: Phosphatid-Fettsäure = 1:2. Auch die Jodzahl ist bei der Phosphatid-Fettsäure viel höher als die der Fett-Fettsäure. Im Muskel ergibt die Menge der Fett-Fettsäure durchschnittlich 1.48% und die der Phosphatid-Fettsäure 0.68%. Im Gegensatz zur Leber ist die Fett-Fettsäure in reichlicherer Menge als Phosphatid-Fettsäure enthalten; das Verhältnis ist Fett-Fettsäure: Phosphatid-Fettsäure = 2:1. Die Jodzahl ist bei Fett-Fettsäure 84.7 und bei Phosphatid-Fettsäure 145.3, sie ist, wie in der Leber, bei Phosphatid-Fettsäure grösser als bei Fett-Fettsäure.

Bei der Betrachtung obiger Ergebnisse macht man die Feststellung, dass die Jodzahl der Fett-Fettsäure in Leber und Muskel fast gleichen Wert zeigen, ebenso die Jodzahl der Phosphatid-Fettsäure in beiden Geweben. Ein Unterschied liegt nur darin, dass die Menge des Phosphatides in der Leber grösser als die im Muskel ist. Es ist eine bekannte Tatsache dass die Jodzahl der Fettsäure in der Leber grösser als die im Muskel ist. Die Hauptursache dieser Erscheinung besteht darin, dass die Leber das Phosphatid, welches aus Fettsäuren mit höherer Jodzahl aufgebaut ist, reichlich enthält.

Versuch II.

Die Versuche wurden in gleicher Weise wie im vorhergehenden

Versuch ausgeführt. Sie unterschieden sich nur darin, dass als zu untersuchendes Fett Leinöl oder Kokosöl verwendet wurden. Die Ergebnisse bei Leinöldiät sind in Tabelle II und die bei Kokosöldiät in Tabelle III wiedergegeben.

TABELLE II(A) Leber.

Tier-Nr.	Fett-Fettsäure		Phosphatid-Fettsäure	
	%	Jodzahl	%	Jodzahl
6	1,08	133,5	2,50	150,9
7	0,88	138,3	2,16	150,5
8	1,99	139,7	2,52	161,9
9	0,73	128,9	2,18	158,0
10	0,75	126,5	3,38	151,2
Mittel	1,09	133,4	2,55	154,5

TABELLE II(B) Muskel.

Tier-Nr.	Fett-Fettsäure		Phosphatid-Fettsäure	
	%	Jodzahl	%	Jodzahl
6	1,93	105,1	0,70	140,0
7	2,23	102,1	0,71	167,1
8	3,19	122,0	0,69	167,8
9	2,48	100,5	0,82	142,2
10	2,35	108,2	0,75	159,3
Mittel	2,44	107,6	0,71	155,3

Wie aus den Ergebnissen in Tabelle II hervorgeht, beträgt die Menge der Fett-Fettsäure in der Leber durchschnittlich 1.09% und die Jodzahl 133.4. Diese Jodzahl ist im Vergleich zu der bei Olivenöldiät in Tabelle I weitaus grösser. Dies beruht darauf, dass die aufgenommene Leinölfettsäure mit grösser Jodzahl an die Leber gelangt. Indes beträgt die Menge der Phosphatid-Fettsäure durchschnittlich 2.55% und die Jodzahl 154.5. Diese Jodzahl ist im Vergleich zu der bei Olivenöldiät ohne merklichen Unterschied. Auch im Muskel beträgt die Jodzahl der Fett-Fettsäure durch-

schnittlich 107.6 und ist grösser als bei Olivenöldiät. Die Jodzahl der Phosphatid-Fettsäure, welche 155.3 beträgt, lässt im Vergleich zu der bei Olivenöldiät keinen grossen Unterschied erkennen. Wie oben erwähnt wurde, ist bei der Leinölfütterung die Jodzahl der Fett-Fettsäure grösser als bei Olivenöldiät und die der Phosphatid-Fettsäure ohne grossen Unterschied.

Diese Tatsache zeigt, dass bei Darreichung des aus Fettsäuren mit grosser Jodzahl aufgebauten Leinöls die Fett-Fettsäuren sowohl der Leber als auch des Muskels deutlich beeinflusst werden, während der Einfluss auf die Phosphatid-Fettsäure gering ist. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Terroine (1930) und Sinclair (1931) überein.

TABELLE III(A) Leber.

Tier-Nr.	Fett-Fettsäure		Phosphatid-Fettsäure	
	%	Jodzahl	%	Jodzahl
11	1,13	73,3	2,41	153,1
12	1,26	83,6	2,15	168,2
13	0,98	85,1	2,56	161,1
14	1,12	84,2	2,68	153,1
15	1,16	83,9	2,62	157,5
Mittel	1,13	82,0	2,48	158,6

TABELLE III(B) Muskel.

Tier-Nr.	Fett-Fettsäure		Phosphatid-Fettsäure	
	%	Jodzahl	%	Jodzahl
11	2,98	62,9	1,21	155,0
12	2,19	65,3	0,87	160,5
13	1,41	63,1	1,79	150,4
14	1,86	66,2	1,41	159,1
15	1,97	65,5	1,18	153,2
Mittel	2,08	64,6	1,29	155,6

Nach den Ergebnissen in Tabelle III beträgt die Menge der Fett-Fettsäure in der Leber der Tiere, die mit Kokosöl gefüttert

wurden, durchschnittlich 1.13% und die Jodzahl 82.0, die Menge der Phosphatid-Fettsäure 2.48% und die Jodzahl 158.6. Diese Jodzahlen sind fast gleich wie bei Olivenöldiät. Im Muskel ergibt die Menge der Fett-Fettsäure 2.08% und die Jodzahl 64.6. Diese Zahl ist im Vergleich zu der bei Olivenöldiät bedeutend kleiner. Die Menge der Phosphatid-Fettsäure beträgt 1.29% und die Jodzahl 155.6. Diese Zahl zeigt keinen grossen Unterschied zu der bei Olivenöldiät.

Versuch III.

In gleicher Weise wie im Versuch I wurden die Tiere mit Olivenöldiät gefüttert und danach wurde beim Hungern die Menge der das Fett und Phosphatid in Leber und Muskel aufbauenden Fettsäure und die Jodzahl derselben ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV wiedergegeben.

TABELLE IV(A) Leber.

Tier-Nr.	Hunger-Tage	Fett-Fettsäure		Phosphatid-Fettsäure	
		%	Jodzahl	%	Jodzahl
16	3	0,73	94,4	1,18	131,0
17	4	0,42	104,2	1,29	129,8
14	4	0,52	103,5	1,71	120,5
19	5	0,67	97,3	1,37	127,1
Mittel	—	0,59	99,9	1,39	127,1

TABELLE IV(B) Muskel.

Tier-Nr.	Hunger-Tage	Fett-Fettsäure		Phosphatid-Fettsäure	
		%	Jodzahl	%	Jodzahl
16	3	0,36	93,8	0,63	120,0
17	4	0,33	113,1	0,62	124,2
18	4	0,54	98,8	0,47	118,8
19	5	0,38	101,5	0,58	121,1
Mittel	—	0,40	101,8	0,58	121,0

Nach den Ergebnissen in Tabelle IV beträgt die Menge der Fett-Fettsäure in der Leber durchschnittlich 0.59% und die Jodzahl 99.9, die der Phosphatid-Fettsäure 1.39% und die Jodzahl 127.1. Aus dem Vergleich dieser Ergebnisse mit den bei normalen Zeiten (Tabelle I A) geht hervor, dass die Fett-Fettsäure und Phosphatid-Fettsäure an Menge abnehmen, und dass die Jodzahl bei der Fett-Fettsäure grösser und bei der Phosphatid-Fettsäure kleiner wird. Diese Ergebnisse stimmen überein mit denen von Koyama (1937). Im Muskel ergibt die Menge der Fett-Fettsäure durchschnittlich 0.40% und die Jodzahl 101.8, die der Phosphatid-Fettsäure 0.58% und die Jodzahl 121.0. Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit den bei normaler Fütterung (Tabelle I B) findet man auch hier, wie in der Leber, dass die Jodzahl Fett-Fettsäure grösser und die der Phosphatid-Fettsäure kleiner wird.

Terroine (1927) (1930) hat das Lipoid im Tierkörper in „élément variable“ und „élément constant“ eingeteilt und angeführt, dass das erstere die Depotsubstanz darstellt und das letztere die zellenaufbauende Substanz ist. Und beim Hungern des Tieres verbrennt das „élément variable“ und das „élément constant“ bleibt im Gewebe zurück. Aus den obigen Ergebnissen geht hervor, dass das „élément variable“ der Fett-Fettsäure eine kleine Jodzahl und das „élément constant“ eine grosse aufweist, während bei der Phosphatid-Fettsäure das „élément variable“ eine grosse und das „élément constant“ eine kleine Jodzahl besitzt.

Versuch IV.

Im gleicher Weise wie im Versuch II wurden die Ratten mit Leinöldiät gefüttert und danach wurde beim Hungern die Menge der Fett und Phosphatid in Leber und Muskel aufbauenden Fettsäure und die Jodzahl ermittelt. Die Ergebnisse bringt Tabelle V.

Nach den Ergebnissen in Tabelle V beträgt die Menge der Fett-Fettsäure in der Leber durchschnittlich 0.54% und die Jodzahl 98.7, die Menge der Phosphatid-Fettsäure 1.22% und die Jodzahl 108.7. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen (Tabelle II) bei normaler Leinölfütterung, so erkennt man, dass das Fett und Phosphatid an Menge abnehmen und die Jodzahl der Fettsäure bei

TABELLE V(A) Leber.

Tier-Nr.	Hunger-Tage	Fett-Fettsäure		Phosphatid-Fettsäure	
		%	Jodzahl	%	Jodzahl
20	3	0,52	116,0	1,33	105,3
21	4	0,62	98,1	1,08	104,2
22	4	0,47	96,1	1,15	102,1
23	4	0,56	84,5	1,32	123,0
Mittel	—	0,54	98,7	1,22	108,7

TABELLE V(B) Muskel.

Tier-Nr.	Hunger-Tage	Fett-Fettsäure		Phosphatid-Fettsäure	
		%	Jodzahl	%	Jodzahl
20	3	0,26	111,1	0,57	125,1
21	4	0,25	107,4	0,54	102,0
22	4	0,24	121,0	0,54	118,1
23	4	0,23	100,0	0,65	96,8
Mittel	—	0,25	109,9	0,58	110,5

Fett und Phosphatid merklich kleiner wird. Die Jodzahl der Fett-Fettsäure wird im Gegensatz zu dem Ergebnis in Versuch III, dass beim Hungern nach der Olivenölfütterung die Jodzahl der Fett-Fettsäure in der Leber grösser wird, hier kleiner. Es wird daher erkannt, dass hier die Fett-Fettsäure mit grosser Jodzahl verbrennt. Daraus geht hervor, dass bei Leinölfütterung die dem „élément variable“ angehörige Fettsäure in Leber die grosse Jodzahl anzeigt.

Die Jodzahl der Phosphatid-Fettsäure der Leber in diesem Versuche wird kleiner, wenn man, wie bei Olivenölfütterung, das Tier bei Hunger hält. Da bei Lein- und auch Olivenölfütterung die Jodzahl fast gleichen Wert zeigt, erscheint es folgerichtig, dass die Jodzahl bei beiden Fällen beim Hungern das gleiche Ergebnis erreicht. Nach diesem Ergebnis zu urteilen, weist die dem „élément variable“ angehörige Fettsäure im Leberphosphatid eine grosse Jodzahl auf.

Die Menge der nach dem Hungern in Muskel zurückgebliebenen Fett-Fettsäure beträgt durchschnittlich 0.25% und die Jodzahl 109.8, die der Phosphatid-Fettsäure durchschnittlich 0.58% und die Jodzahl 110.5. Aus dem Vergleich dieses Ergebnisses mit dem bei normaler Diät (Tabelle II B) geht hervor, dass die Menge der Fettsäure in Fett und Phosphatid abnimmt, besonders deutlich beim Fett; dabei ist die Jodzahl der Fett-Fettsäure fast unverändert. Die Jodzahl der Fett-Fettsäure vor dem Hungern ist 107.6, und weil dieser Wert mit der Jodzahl 109.8 der dem „élément constant“ angehörigen Fettsäure zufällig übereinstimmt, erscheint deshalb trotz der merklichen Abnahme der Fettsäure die Jodzahl unverändert. Also ist hierbei die Jodzahl der dem „élément variable“ angehörigen Fettsäure beinahe 108 und grösser als die bei Olivenöl-fütterung. Die Jodzahl der Phosphatid-Fettsäure ist im Vergleich zu der bei normalen Zeiten (Tabelle II B) bedeutend kleiner, was die gleiche Erscheinung wie im Versuch III ist.

Versuch V.

In gleicher Weise wie im Versuch II wurden die Ratten mit Kokosöl gefüttert und danach wurde beim Hungern die Menge der Fett und Phosphatid aufbauenden Fettsäure und ihre Jodzahl in der Leber und dem Muskel ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI wiedergegeben.

Nach den Ergebnissen in Tabelle VI beträgt die Menge der Fett-Fettsäure in der Leber durchschnittlich 0.6% und die Jodzahl

TABELLE VI(A) Leber.

Tier-Nr.	Hunger-Tage	Fett-Fettsäure		Phosphatid-Fettsäure	
		%	Jodzahl	%	Jodzahl
24	4	0,37	115,0	0,84	121,1
25	5	0,59	112,0	1,45	132,0
26	7	0,71	126,9	1,15	130,9
27	8	0,74	121,9	1,18	129,2
Mittel	—	0,60	118,9	1,15	128,3

TABELLE VI(B) Muskel.

Tier-Nr.	Hunger-Tage	Fett-Fettsäure		Phosphatid-Fettsäure	
		%	Jodzahl	%	Jodzahl
24	4	0,47	100,0	0,61	92,3
25	5	0,35	95,7	0,58	103,9
26	7	0,25	111,2	0,55	105,0
27	8	0,48	93,9	0,56	118,9
Mittel	—	0,38	100,2	0,57	105,0

118.9, die Menge der Phosphatid-Fettsäure 1.15% und die Jodzahl 128.3. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den bei normaler Kokosölfütterung (Tabelle III A), so erkennt man, dass die Menge der Fett-Fettsäure in der Leber abnimmt und ihre Jodzahl bedeutend grösser wird. Also besteht hier das „élément variable“ aus Fettsäure mit kleiner Jodzahl. Die Menge der Phosphatid-Fettsäure nimmt ebenfalls ab, jedoch wird ihre Jodzahl kleiner. Also ist die Jodzahl der das „élément variable“ darstellenden Fettsäure gross.

Die Menge der Fett-Fettsäure im Muskel beträgt durchschnittlich 0.38% und die Jodzahl 100.2, die Menge der Phosphatid-Fettsäure durchschnittlich 0.57% und die Jodzahl 105.0. Im Vergleich zu den Ergebnissen bei normalen Zeiten (Tabelle III B) nimmt die Fett-Fettsäure an Menge beträchtlich ab und ihre Jodzahl vergrössert sich auffallend. Also ergibt sich wie in der Leber die Jodzahl der dem „élément variable“ angehörenden Fettsäure klein. Die Phosphatid-Fettsäure nimmt ebenfalls ab und ihre Jodzahl wird kleiner. Also besteht das „élément variable“ aus Fettsäure mit grosser Jodzahl.

BESPRECHUNG UND ZUSAMMENFASSUNG.

1) Wenn man die Ratten mit Olivenöldiät, welche aus der Basaldiät und dem in 10%-Menge zugesetzten Olivenöl besteht, verfüttert und nach 10 tägiger Fütterung die Menge der Fett-Fettsäure und Phosphatid-Fettsäure in der Leber betrachtet, so

erkennt man, dass, wie Tabelle VII(A) es zeigt, die erstere durchschnittlich 1.11% und die letztere durchschnittlich 2.32% beträgt; also entspricht die erstere etwa $\frac{1}{2}$ der letzteren. Jedoch sinkt beim Hungern (Tabelle VII(B)) die Fett-Fettsäure 0.58% und die Phosphatid-Fettsäure auf 1.25%, beide haben bis auf die Hälfte der Menge bei normalen Zeiten abgenommen. Hieraus geht hervor, dass das quantitative Verhältnis der Fett-Fettsäure und Phosphatid-Fettsäure in der Leber bei normalen Zeiten und auch beim Hungern 1:2 zeigt.

TABELLE VII(A).

Diät	Fett-Fettsäure (%)		Phosphatid-Fettsäure (%)	
	Leber	Muskel	Leber	Muskel
Olivenöl	1,11	1,48	2,05	0,68
Leinöl	1,09	2,44	2,55	0,71
Kokosöl	1,13	2,08	2,48	1,29
Mittel	1,11	2,00	2,32	0,89

TABELLE VII(B).

Diät	Fett-Fettsäure (%)		Phosphatid-Fettsäure (%)	
	Leber	Muskel	Leber	Muskel
Olivenöl	0,59	0,40	1,39	0,58
Leinöl	0,54	0,25	1,22	0,58
Kokosöl	0,60	0,38	1,15	0,57
Mittel	0,58	0,34	1,25	0,58

2) Die Menge der Fett-Fettsäure und Phosphatid-Fettsäure in Muskel beträgt, wie die Tabelle VII(A) es zeigt, bei ersterer durchschnittlich 2.00% und bei letzterer 0.89%, das Verhältnis der ersteren zu letzteren ist 2:1. Beim Hungern (Tabelle VII(B)) wird die Fett-Fettsäure 0.34%, nimmt also bis auf $\frac{1}{6}$ der Menge bei normalen Zeiten ab. Vergleicht man dies mit der Abnahme der Fett-Fettsäure in der Leber, so erkennt man, dass der Grad der Abnahme hier sehr gross ist. Das beruht darauf, dass das dem

„élément variable“ angehörige Fett, d.h. das Depotfett im Muskel viel reichlicher enthalten ist als in der Leber. Die Menge der Phosphatid-Fettsäure wird beim Hungern 0.58% und nimmt um $\frac{1}{3}$ des normalen Wertes ab.

3) Die Jodzahl der Fett-Fettsäure im Muskel ist, wie Tabelle VIII(A) es zeigt, bei der Fütterung mit dem Fettsäure mit hoher Jodzahl enthaltenden Leinöl gross und bei der Fütterung mit dem Fettsäure mit kleiner Jodzahl enthaltenden Koksöl klein. Bei beiden lässt jedoch die Jodzahl der Phosphatid-Fettsäure fast keinen Unterschied erkennen. Nach der Untersuchung von Joannovicus (1910) und Shioji (1924) wird die Phosphatid-Fettsäure auch durch das Diätfett beeinflusst und dieser Einfluss auf die Phosphatidfettsäure ist geringer als die auf die Fettfett-säure. Es konnte hier auch festgestellt werden, dass die Fett-Fettsäure im Muskel durch verschiedene Arten des Fettes in der

TABELLE VIII(A).

Diät	Jodzahl			
	Fett-Fettsäure (%)		Phosphatid-Fettsäure (%)	
	Leber	Muskel	Leber	Muskel
Olivenöl	87,9	84,7	142,9	145,3
Leinöl	133,4	107,6	154,5	155,3
Kokosöl	82,0	64,6	158,6	155,6
Mittel	101,1	85,6	152,0	152,1

TABELLE VIII(B).

Diät	Jodzahl			
	Fett-Fettsäure (%)		Phosphatid-Fettsäure (%)	
	Leber	Muskel	Leber	Muskel
Olivenöl	99,9	101,8	127,1	121,0
Leinöl	98,7	109,9	108,7	110,5
Kokosöl	118,9	100,2	128,3	105,0
Mittel	105,8	103,9	121,0	112,2

Diät stark beeinflusst wird, während die Phosphatid-Fettsäure von denselben wenig beeinflusst wird.

4) Die Jodzahl der Fett-Fettsäure in der Leber (Tabelle VIII (B)) ist bei Leinölfütterung grösser als bei Olivenölfütterung, verhält sich aber bei der Kokosölfütterung fast gleich wie bei der Olivenölfütterung. Aus dieser Tatsache kann man schliessen, dass die Fett-Fettsäure in der Leber bei Leinöldiät durch die darin enthaltene Fettsäure mit hoher Jodzahl beeinflusst wird wie die Fettsäure in dem Muskel, während bei der Kokosöldiät sie durch die darin enthaltene gesättigte Fettsäure nicht beeinflusst wird, doch wird diese wahrscheinlich in der Leber in ungesättigte Fettsäure umgewandelt. Neuerdings hat Longenecker (1939) bei den mit Kokosöl gefütterten Ratten erkannt, dass die Hauptfettsäuren des Kokosöls, die Laurin- und Myristinsäure, im Tierkörper in ungesättigte Fettsäure umwandeln. Diese Tatsache stimmt mit der Behauptung von Leathes (1909), dass in der Leber eine die gesättigte Fettsäure in die ungesättigte verwandelnde Funktion vorhanden sei, überein. Die Jodzahl der Phosphatid-Fettsäure in der Leber wird von der Art des Fettes in der Diät wenig beeinflusst, und zeigt stets einen fast gleichen Wert von 152.0 im Durchschnitt.

5) Die Jodzahl der Phosphatid-Fettsäure im Muskel (Tabelle VIII(A)) beträgt durchschnittlich 152.1 und ergibt auch in der Leber 152.0. Hieraus geht hervor, dass der ungesättigte Grad der Phosphatid-Fettsäure in der Leber und auch im Muskel fast gleich ist.

6) Die Jodzahl der Fett-Fettsäure im Muskel ist, wie in Tabelle VIII(A) gezeigt, zwar nach der Art des Fettes sehr verschieden, sie ist aber nach dem Hungern beinahe konstant. Wie Tabelle VIII(B) zeigt, variiert die Jodzahl zwischen 100.2 und 109.9 und ergibt durchschnittlich 103.9. Also weist die dem „élément constant“ angehörige Fett-Fettsäure die Jodzahl von etwa 105 auf. Diese Zahl stimmt mit dem Ergebnis, welches Hodge u. a. (1941) an Mäusen erhalten haben, fast überein.

Die Jodzahl der Fett-Fettsäure im Muskel ist beim Hungern nach der Oliven- und Kokosölfütterung grösser als die vor dem Hungern. Es konnte also festgestellt werden, dass hier die Jodzahl

der dem „*élément variable*“ angehörigen Fettsäure kleiner als die der dem „*élément constant*“ angehörigen Fettsäure ist. Da aber bei der Leinölfütterung die Jodzahl der den „*élément variable*“ darstellenden Fettsäure nahe der der „*élément constant*“ darstellenden Fettsäure steht, ist sie beim Hungern unverändert.

7) Die Jodzahl der Phosphatid-Fettsäure im Muskel ist auch bei jeder Fettdiät fast konstant und beträgt, wie oben schon erwähnt wurde, durchschnittlich 152.1. Beim Hungern (Tabelle VIII(B)) schwankt sie zwischen 105.0 und 121.0 und ergibt durchschnittlich 112.2. Dieses Ergebnis zeigt, dass beim Hungern die Menge der Phosphatid-Fettsäure abnimmt und die Jodzahl kleiner wird. Es wurde also festgestellt, dass die Jodzahl der dem „*élément variable*“ angehörigen Phosphatid-Fettsäure grösser als die der dem „*élément constant*“ angehörigen Fettsäure ist.

8) Die Jodzahl der Fett-Fettsäure in der Leber ergibt beim Hungern (Tabelle VIII(A)) auch bei jeder Fettdiät einen fast gleichen Wert, indem sie zwischen 98.7 und 118.9 schwankt und durchschnittlich 105.8 beträgt. Die Jodzahl der Fett-Fettsäure vor dem Hungern beträgt bei Leinöldiät 133.4 und bei Oliven- und Kokosöldiät je 87.9 und 82.0, deshalb weist die Jodzahl der Fett-Fettsäure in der Leber beim Hungern nach der Fütterung mit Oliven- und Kokosöldiät einen grösseren und beim Hungern nach der Leinöldiät einen kleineren Wert auf. Nach diesem Ergebnis ist die Jodzahl der als „*élément constant*“ zu fassenden Fett-Fettsäure etwa 105; sind dann Fett-Fettsäuren mit grösserer oder mit kleinerer Jodzahl als 105 vorhanden, so verschwinden sie beim Hungern als „*élément variable*“. Es wird deshalb erkannt, dass in der Leber bei der Benutzung der Fett-Fettsäuren dieselben mit solchen Jodzahlen, welche bedeutend grösser oder bedeutend kleiner als etwa 100 sind, zuerst benutzt wird. Wie schon erwähnt wurde, ist man in den bisherigen Untersuchungen oft zu dem Ergebnis gekommen, dass beim Hungern die Jodzahl der Fett-Fettsäure in Muskel zunimmt. Dies beruht nach meiner Untersuchung darauf, dass die Jodzahl des „*élément variable*“ unter 100 lag.

Die Jodzahl der dem „*élément constant*“ angehörenden Fett-Fettsäure in der Leber ergibt 105.8 und die im Muskel 103.9, daher

ist der ungesättigte Grad der das „*élément constant*“ darsellenden Fett-Fettsäure bei Leber und Muskel fast gleich.

9) Die Jodzahl der Phosphatid-Fettsäure in der Leber beträgt durchschnittlich 152.0, schwankt beim Hungern (Tabelle VIII(B)) zwischen 108.7 und 128.3 und ergibt durchschnittlich 121.0. Hieraus geht hervor, dass die Jodzahl der dem „*élément variable*“ angehörenden Phosphatid-Fettsäure als die der dem „*élément constant*“ angehörenden grösser ist, und dass die erstere Fettsäure beim Hungern verbraucht wird, so dass die Jodzahl dabei kleiner wird. Es kann weiter festgestellt werden, dass die Jodzahl der als „*élément constant*“ zu fassenden Phosphatid-Fettsäure in Leber und Muskel je 121.0 und 112.0 zeigt und dass beide sich nahe liegen.

10) Da Koyama (1937) festgestellt hat, dass beim Hungern der Maus die Jodzahl der Fett-Fettsäure grösser wird, nahm er an, dass die gesättigte Fettsäure in reichlicher Menge verbrennt. Im allgemeinen ist die Jodzahl des Depotfettes der Tiere bei normaler Diät 60 etwa 80, ist merklich kleiner als die der als „*élément constant*“ zu fassenden Fettsäure. Es ist aus meinen obigen Ergebnissen verständlich, dass beim Hungern das eine kleinere Jodzahl als 100 zeigende Depotfett benutzt wird und wie die Ergebnisse der Versuche von Koyama zeigen, die Jodzahl der Fett-Fettsäure grösser wird. Fernerhin hat Koyama beobachtet, dass beim Hungern die ungesättigte Fettsäure in Phosphatid-Fettsäure benutzt und die Jodzahl der Fettsäure kleiner wird. Auch in diesem Falle kann man aus Verfassers Ergebnissen erschen, dass die Jodzahl der dem „*élément variable*“ angehörigen Fettsäure grösser als die der dem „*élément constant*“ angehörigen ist, und dass deswegen die Jodzahl der nach dem Hungern zurückbleibenden Fettsäure kleiner wird.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Dr. Y. Sueyoshi für seine Anregung und Anleitung bei dieser Arbeit meinen besten Dank aus.

LITERATUR.

- Hodge, MacLachlan, Bloor, Stoneburg, Oleson u. Whitehead
(1941): J. Biol. Chem. **139**, 897.
- Joannovicus u. Pick (1910): Wien. Klin. Ws. **23**, 573.
- Jost u. Sorg (1932): Pfl. Arch. **231**, 143.
- Koyama (1937): J. Biochem. **25**, 141.
- Leathes u. Kennaway (1909): Proc. Roy. Soc. Med. S. **136**,
- Longenecker (1939): J. Biol. Chem. **129**, 13.
- Sinclair (1931): J. Biol. Chem. **92**, 245.
- Shioji (1924): J. Biochem. **4**, 43.
- Terroine (1927): Bull. Soc. Chim. Biol. **9**, 12; (1930): ebenda **12**, 674.

ÜBER DEN GEHALT DER GEWEBE AN VERSCHIEDENEN UNGESÄTTIGTEN, FETTSÄUREN IM FETT UND PHOSPHATID BEI NORMAL- SOWIE FETTDIÄT.

VON

KIJIRO MATUBARA.

(Aus dem mediz.-chem. Institut der Keio-Universität, Tokyo.
Vorstand: Prof. Y. Sueyoshi.)

(Eingegangen am 5. Februar 1942.)

I. EINLEITUNG.

Die in Leber und Muskel enthaltene ungesättigte Fettsäure findet sich vorwiegend im Fett und Phosphatid, ihre Menge in den anderen Fettstoffen ist sehr gering. Über das Vorkommen ungesättigten Fettsäuren haben viele Autoren besonders Klenk (1930–1935) erfolgreich berichtet. Da aber noch keine systematische Untersuchung über die Mengenverhältnisse der einzelnen Fettsäuren besteht, welche in den ungesättigten Fettsäuren enthalten sind, die in Leber und Muskel das Fett und Phosphatid aufbauen, und auch darüber, wieweit diese Mengen bei verschiedener Fettnahrung beeinflusst werden, habe ich in dieser Untersuchung danach gestrebt, diese Fragen zu ergründen.

II. UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND METHODE.

Es ist eine bekannte Tatsache, dass der Einfluss der Fettnahrung auf die Fettsubstanz im Organismus deutlich parallel zur Fettmenge in der Nahrung steht. Ich habe daher gemäss den Versuchen von Sueyoshi und Tooyama (1942) Tauben mit kohlehydratfreier Fettnahrung gefüttert und für die Versuche verwendet. Die zusammengesetzte Nahrung bestand aus 80 g Fett, 8 g Kasein, 4 g anorganischen Salzen und 4 g Oryzanin (Vitamin B-Komplex). Von dieser Nahrung wurden je 3 g pro 100 g Körpergewicht zwangsweise verabfolgt und nach 2 wöchentlicher Fütterung

wurde die Analyse an der Leber und dem *M. pectoralis major* durchgeführt. Das für die Fettnahrung verwendete Fett war Olivenöl (Jodzahl 81), Leinöl (Jodzahl 165) und Kokosöl (Jodzahl 7). Die Ausführung der Analyse erfolgte in der Weise, dass gemäss der Miuraschen Methode (1939) das Phosphatid und Fett isoliert und die darin befindlichen verschiedenartigen, ungesättigten Fettsäuren im Zustand der Bromfettsäure bestimmt wurden. Die Fettsäuremenge wurde aus der Bromfettsäure errechnet. So wurde die Dibromfettsäure als Oleinsäure mit 2 Molekülen Brom, Tetrabromfettsäure als Linolsäure mit 4 Molekülen Brom, Hexabromfettsäure als Linolensäure mit 6 Molekülen Brom und Octabromfettsäure als Arachidonsäure mit 8 Molekülen Brom angesprochen; von jeder dieser Fettsäuren wurde die Brommenge subtrahiert und die entsprechende Fettsäuremenge errechnet.

III. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE.

Versuch 1.

Die Ergebnisse der Analyse an Tauben, welche mit normaler Nahrung (unpoliertem Reis und Gemüse) gefüttert worden waren, sind in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I(A) zeigt den Gehalt der Fett-Bromfettsäure in der Leber, davon entfallen auf Dibromfettsäure durchschnittlich 1,63%, Tetrabromfettsäure 0,036%, Hexabromfettsäure 0,015%, und Octabromfettsäure 0,012%. Nach diesen Ergebnissen gehört der grösste Teil der gesamten Bromfettsäure (gesamt. Br-F.S.) zur Dibromfettsäure und nimmt 95,4% ein. Daran schliesst sich die Tetrabromfettsäure, die sich auf 2,36% beläuft, die Hexabromfettsäure und Octabromfettsäure sind sehr gering und ergeben je 0,97% und 0,81%. Die Phosphatid-Bromfettsäure in der Leber enthält, wie in Tabelle I(B) angegeben durchschnittlich 2,06% Dibromfettsäure. Ihr Gehalt ist im Vergleich zu der im Leberfett nur wenig grösser, während der Gehalt an Tetrabromfettsäure 0,309% beträgt, was etwa dem 10-fachen Gehalt derjenigen des Leberfettes entspricht. Auch die Menge der Hexabromfettsäure ist 0,111% und entspricht etwa der 8-fachen, und die der Octabromfettsäure ist 0,112% und

TABELLE I(A). (Leberfett).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fettsäure in %	Dibrom-fettsäure in %	Tetrabrom-fettsäure in %	Hexabrom-fettsäure in %	Octabrom-fettsäure in %
1	Leber	1,456	1,374	0,045	0,015	0,021
	gesamt. Br-F. S.	—	93,10	3,10	1,04	1,43
2	Leber	1,117	1,068	1,031	0,009	0,007
	gesamt. Br-F. S.	—	94,65	2,81	0,87	0,65
3	Leber	1,993	1,931	2,030	0,017	0,014
	gesamt. Br-F. S.	—	96,89	1,50	0,87	0,71
4	Leber	1,520	1,475	0,023	0,012	0,009
	gesamt. Br-F. S.	—	95,47	1,68	0,80	0,61
5	Leber	1,261	1,210	0,027	0,015	0,009
	gesamt. Br-F. S.	—	96,82	2,15	1,20	0,76
6	Leber	1,832	1,744	0,053	0,021	0,013
	gesamt. Br-F. S.	—	95,64	2,90	1,16	0,75
Mittel	Leber	1,530	1,634	0,035	0,015	0,012
	gesamt. Br-F. S.	—	95,43	2,36	0,97	0,81

TABELLE I(B). (Leberphosphatid).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fettsäure in %	Dibrom-fettsäure in %	Tetrabrom-fettsäure in %	Hexabrom-fettsäure in %	Octabrom-fettsäure in %
1	Leber	2,257	1,759	0,241	0,114	0,143
	gesamt. Br-F. S.	—	76,20	10,40	4,94	6,20
2	Leber	2,205	1,643	0,344	0,104	0,113
	gesamt. Br-F. S.	—	47,50	15,60	4,73	5,15
3	Leber	2,613	2,142	0,217	0,094	0,058
	gesamt. Br-F. S.	—	58,60	8,68	3,76	6,33
4	Leber	2,823	2,260	0,364	0,106	0,092
	gesamt. Br-F. S.	—	80,06	12,90	3,76	3,26
5	Leber	2,211	1,767	0,248	0,111	0,083
	gesamt. Br-F. S.	—	85,33	12,10	5,34	4,02
6	Leber	3,458	2,798	0,438	0,139	0,083
	gesamt. Br-F. S.	—	76,27	12,46	3,79	5,02
Mittel	Leber	2,595	2,062	0,309	0,111	0,112
	gesamt. Br-F. S.	—	79,66	12,02	4,39	4,98

TABELLE I(C). (Muskelfett).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fettsäure in %	Dibrom-fettsäure in %	Tetrabrom-fettsäure in %	Hexabrom-fettsäure in %	Octabrom-fettsäure in %
1	Muskel gesamt. Br-F. S.	1,485 —	1,393 95,50	0,052 3,58	0,019 1,16	0,020 1,36
2	Muskel gesamt. Br-F. S.	1,668 —	1,551 92,80	0,064 3,83	0,034 2,03	0,019 1,13
3	Muskel gesamt. Br-F. S.	2,030 —	1,923 95,19	0,069 3,41	0,026 1,30	0,012 0,60
4	Muskel gesamt. Br-F. S.	1,731 —	1,651 95,93	0,037 2,12	0,028 1,167	0,014 0,83
5	Muskel gesamt. Br-F. S.	1,683 —	1,587 94,57	0,061 3,75	0,019 1,18	0,015 0,89
6	Muskel gesamt. Br-F. S.	1,340 —	1,267 95,22	0,032 2,41	0,027 2,03	0,014 1,05
Mittel	Muskel gesamt. Br-F. S.	1,656 —	1,562 94,87	0,052 3,18	0,025 1,56	0,015 0,98

TABELLE I(D). (Muskelposphatid).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fettsäure in %	Dibrom-fettsäure in %	Tetrabrom-fettsäure in %	Hexabrom-fettsäure in %	Octabrom-fettsäure in %
1	Muskel gesamt. Br-F. S.	2,458 —	1,793 70,20	0,404 15,80	0,090 3,55	0,170 6,65
2	Muskel gesamt. Br-F. S.	1,853 —	1,145 95,94	0,452 23,22	0,105 5,45	0,142 7,37
3	Muskel gesamt. Br-F. S.	1,981 —	1,468 74,14	0,314 15,82	0,085 4,29	0,114 5,75
4	Muskel gesamt. Br-F. S.	2,314 —	1,467 62,85	0,582 24,93	0,106 4,55	0,159 6,81
5	Muskel gesamt. Br-F. S.	2,194 —	1,501 68,21	0,472 12,40	0,091 4,14	0,129 5,10
6	Muskel gesamt. Br-F. S.	2,200 —	1,470 66,81	0,419 19,04	0,086 3,90	0,225 10,22
Mittel	Muskel gesamt. Br-F. S.	2,166 —	1,475 67,03	0,440 20,04	0,093 4,32	0,156 6,98

entspricht der 10-fachen Menge im Leberfett.

Betrachtet man nun den prozentualen Wert jeder Bromfettsäure gegenüber der gesamten Bromfettsäuremenge im Phosphatid, so findet man, dass die Tetrabromfettsäure den prozentualen Wert von 12,0% zeigt, welcher im Vergleich mit 2,3% im Leberfett viel grösser ist, und dass die Menge der Hexabromfettsäure im Leberfett nur 0,97%, hingegen im Leberphosphatid 4,3% beträgt. Die Menge der Octabromfettsäure ergibt im Leberfett nur 0,81%, dagegen im Leberphosphatid 4,9%.

Betrachtet man alsdann den Gehalt der Fett-Bromfettsäure im Muskel so findet man, wie in Tabelle I(C) angegeben, an Dibromfettsäure 1,56%, Tetrabromfettsäure 0,052%, Hexabromfettsäure 0,025% und Octabromfettsäure 0,015%. Wie in der Leber nimmt auch hier die Dibromfettsäure 94,8% der gesamten Bromfettsäuremenge ein, und die Menge der übrigen Bromfettsäuren ist gering.

Von dem Gehalt der Phosphatid-Bromfettsäure im Muskel sind, wie Tabelle I(D) zeigt, Dibromfettsäure 1,47%, was keinen Unterschied zwischen der im Fett ausmacht, während die Menge der Tetrabromfettsäure 0,440% beträgt und 9-fach, die der Hexabromfettsäure 0,093% beträgt und 3-fach und auch die der Octabromfettsäure 0,156% beträgt und 10-fach grösser als diejenigen der genannten Fettsäuren im Fett ist. Es ergibt sich der prozentuale Wert jeder Bromfettsäure gegenüber der gesamten Bromfettsäuremenge an Tetra-, Hexa- und Octabromfettsäure je 20,0%, 4,3%, und 6,9%, also ein viel höherer Wert als im Fett.

Beim Überblicken der obigen Ergebnisse macht man die Feststellung, dass sowohl in der Leber als auch im Muskel die Tetra-, Hexa- und Octabromfettsäure im Phosphatid in grösserer Menge vorhanden sind und im Fett wenig vorkommen.

Der Gehalt jeder Bromfettsäure im Fett ist in den Leber- und Muskelgeweben kaum verschieden; auch der Gehalt jeder Bromfettsäure im Phosphatid lässt in diesen beiden Geweben keinen merklichen Unterschied erkennen.

Versuch 2.

Alsdann wurde an Leber und Muskel der Tiere, welche mit

Olivöl gefüttert worden waren, jede Bromfettsäuremenge im Fett und Phosphatid ermittelt; dabei wurden die folgenden Ergebnisse erhalten.

Fett-Bromfettsäure in der Leber enthält, wie in Tabelle II(A) angegeben, an Dibromfettsäure 2,31%, Tetrabromfettsäure 0,089%, Hexabromfettsäure 0,018% und Octabromfettsäure 0,019%. In der gesamten Bromfettsäure gehören 94,8% zur Dibromfettsäure; die Tetrabromfettsäure ergibt 3,74% und die übrigen Bromfettsäuren sind sehr gering.

TABELLE II(A). (Leberfett).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fettsäure in %	Dibromfettsäure in %	Tetrabromfettsäure in %	Hexabromfettsäure in %	Octabromfettsäure in %
7	Leber	2,213	2,078	0,088	0,018	0,028
	gesamt. Br-F.S.	—	96,09	4,10	0,87	1,30
8	Leber	1,966	1,856	0,075	0,013	0,019
	gesamt. Br-F.S.	—	93,61	3,80	0,68	1,00
9	Leber	3,146	3,006	0,105	0,222	0,010
	gesamt. Br-F.S.	—	94,92	3,32	0,73	0,33
Mittel	Leber	2,441	2,314	0,089	0,018	0,019
	gesamt. Br-F.S.	—	94,87	3,74	0,76	0,88

TABELLE II(B). (Leberphosphatid).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fettsäure in %	Dibromfettsäure in %	Tetrabromfettsäure in %	Hexabromfettsäure in %	Octabromfettsäure in %
7	Leber	2,38	1,617	0,548	0,073	0,136
	gesamt. Br-F.S.	—	68,05	23,09	3,09	5,75
8	Leber	2,71	1,767	0,682	0,111	0,157
	gesamt. Br-F.S.	—	65,00	25,10	4,09	5,78
9	Leber	2,97	2,076	0,666	0,105	0,119
	gesamt. Br-F.S.	—	69,99	22,43	3,54	4,01
Mittel	Leber	2,69	1,821	0,632	0,096	0,137
	gesamt. Br-F.S.	—	67,68	23,54	3,57	5,18

TABELLE II(C). (Muskelfett).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fettsäure in %	Dibrom-fettsäure in %	Tetrabrom-fettsäure in %	Hexabrom-fettsäure in %	Octabrom-fettsäure in %
7	Muskel	2,002	1,845	0,120	0,011	0,025
	gesamt. Br-F. S.	—	95,49	6,22	0,50	1,32
8	Muskel	1,966	1,775	0,150	0,015	0,026
	gesamt. Br-F. S.	—	94,90	7,99	0,80	1,38
9	Muskel	2,375	2,161	0,170	0,020	0,024
	gesamt. Br-F. S.	—	95,09	7,47	0,88	1,05
Mittel	Muskel	2,114	1,927	0,146	0,015	0,025
	gesamt. Br-F. S.	—	95,16	7,23	0,73	1,25

TABELLE II(D). (Muskelposphatid).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fettsäure in %	Dibrom-fettsäure in %	Tetrabrom-fettsäure in %	Hexabrom-fettsäure in %	Octabrom-fettsäure in %
7	Muskel	1,47	0,954	0,347	0,065	0,109
	gesamt. Br-F. S.	—	64,67	23,53	4,40	7,39
8	Muskel	1,88	1,279	0,376	0,092	0,134
	gesamt. Br-F. S.	—	67,99	19,98	4,89	7,12
9	Muskel	2,18	1,334	0,567	0,059	0,186
	gesamt. Br-F. S.	—	61,11	25,98	4,35	8,52
Mittel	Muskel	1,84	1,189	0,430	0,084	0,143
	gesamt. Br-F. S.	—	64,59	23,16	4,55	7,68

Der Gehalt der Phosphatid-Bromfettsäure in der Leber besteht, wie Tabelle II(B) zeigt, aus Dibromfettsäure 1,82%, Tetrabromfettsäure 0,63%, Hexabromfettsäure 0,096% und Octabromfettsäure 0,137%.

Die Menge jeder Bromfettsäure im Fett und Phosphatid in der Leber der Tiere, welche mit Olivenöldiät gefüttert wurden, sind fast gleich denjenigen bei normaler Kost. Jedoch nimmt bei Olivenöldiät der Gehalt der Fett-Bromfettsäure im Lebergewebe im Vergleich zu dem bei normaler Kost zu, sodass die gesamte Bromfett-

säuremenge bei Olivenöldiät im Gegensatz zu der von 1,53% bei normaler Kost 2,44% zeigte. Dies zeigt eindeutig, den Einfluss der Fettdiät. Auch die Menge der Phosphatid-Tetrabromfettsäure ist bei Olivenöldiät höher als diejenige bei normaler Kost, und beträgt bei letzterer 0,30%, hingegen bei ersterer 0,63%. Es hat sich somit gezeigt, dass der Gehalt in der gesamten Bromfettsäure bei letzterer nur 12,0%, hingegen bei ersterer 23,5% ist.

Was den Gehalt der Fett-Bromfettsäure im Muskel anbelangt, so ergeben sich, wie in Tabelle II (C) angegeben, an Dibromfettsäure 1,92%, Tetrabromfettsäure 0,146%, Hexabromfettsäure 0,015% und Octabromfettsäure 0,025%. Auch hier ist die Menge der Tetrabromfettsäure höher als diejenige bei normaler Kost.

Der Gehalt der Phosphatid-Bromfettsäure im Muskel besteht, wie in Tabelle II (D) angegeben, aus Dibromfettsäure 1,18%, Tetrabromfettsäure 0,130%, Hexabromfettsäure 0,084% und Octabromfettsäure 0,143%. Diese Ergebnisse sind fast gleich denen bei normaler Kost.

Versuch 3.

Wie im vorigen Versuch wurde bei Leber und Muskel der Tauben, welche mit Leinöldiät gefüttert worden waren, jede Bromfettsäuremenge des Fettes und Phosphatids ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengestellt.

TABELLE III(A). (Leberfett).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fettsäure in %	Dibrom-fettsäure in %	Tetrabrom-fettsäure in %	Hexabrom-fettsäure in %	Octabrom-fettsäure in %
10	Leber	1,477	1,103	0,287	0,718	0,014
	gesamt. Br-F. S.	—	76,80	20,02	4,99	0,989
11	Leber	2,072	1,606	0,279	0,164	0,022
	gesamt. Br-F. S.	—	77,52	13,47	7,94	1,073
12	Leber	1,629	1,166	1,358	0,097	0,007
	gesamt. Br-F. S.	—	71,56	21,98	6,00	0,45
Mittel	Leber	1,726	1,291	0,308	0,111	0,014
	gesamt. Br-F. S.	—	75,26	18,49	6,31	0,83

TABELLE III(B). (Leberphosphatid).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fettsäure in %	Dibrom-fettsäure in %	Tetrabrom-fettsäure in %	Hexabrom-fettsäure in %	Octabrom-fettsäure in %
10	Leber gesamt. Br-F. S.	2,796 —	1,864 66,68	0,736 26,34	0,092 3,324	0,101 3,63
11	Leber gesamt. Br-F. S.	2,800 —	1,516 54,16	1,016 36,31	0,114 4,09	0,152 5,43
12	Leber gesamt. Br-F. S.	3,035 —	1,954 64,37	0,770 25,39	0,141 4,66	0,168 5,55
Mittel	Leber gesamt. Br-F. S.	2,877 —	1,778 64,74	0,841 29,35	0,116 4,023	0,140 4,87

TABELLE III(C). (Muskelfett).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fettsäure in %	Dibrom-fettsäure in %	Tetrabrom-fettsäure in %	Hexabrom-fettsäure in %	Octabrom-fettsäure in %
10	Muskel gesamt. Br-F. S.	5,357 —	4,482 85,21	0,497 9,44	0,363 6,90	0,017 0,33
11	Muskel gesamt. Br-F. S.	6,555 —	5,071 77,35	0,756 11,53	0,712 10,86	0,016 0,24
12	Muskel gesamt. Br-F. S.	4,768 —	3,852 80,78	0,391 8,19	0,498 10,44	0,027 1,58
Mittel	Muskel gesamt. Br-F. S.	5,561 —	4,468 81,11	0,548 9,72	0,524 9,40	0,030 0,38

TABELLE III(D). (Muskelposphatid).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fettsäure in %	Dibrom-fettsäure in %	Tetrabrom-fettsäure in %	Hexabrom-fettsäure in %	Octabrom-fettsäure in %
10	Muskel gesamt. Br-F. S.	1,862 —	1,228 65,95	0,475 25,51	0,067 3,59	0,092 4,94
11	Muskel gesamt. Br-F. S.	2,091 —	1,161 55,52	0,618 29,55	0,122 5,83	0,190 9,08
12	Muskel gesamt. Br-F. S.	1,980 —	1,207 60,95	0,494 24,94	0,118 5,95	0,161 8,13
Mittel	Muskel gesamt. Br-F. S.	1,978 —	1,198 30,81	0,529 26,67	0,102 5,13	0,147 7,38

Tabelle III(A) zeigt, den Gehalt der Fett-Bromfettsäure in der Leber, bestehend aus Dibromfettsäure 1,29%, Tetrabromfettsäure 0,308%, Hexabromfettsäure 0,111% und Octabromfettsäure 0,014%. Vergleicht man die Ergebnisse mit denen bei normaler Kost, so findet man, dass sich an Tetra- und auch Hexabromfettsäure die 8-fach grösseren Mengen ergeben, indem der prozentuale Wert dieser beiden Bromfettsäuren gegenüber der gesamten Bromfettsäuremenge bei der ersteren bei normaler Kost 2,36%, aber in diesem Fall 18,49% ausmacht. Bei der letzteren beträgt er bei normaler Kost 0,97%, zeigte aber hier 6,31%. Es wurde somit nachgewiesen, dass bei Leinöldiät Tetra- und Hexabromfettsäure im Fett bedeutend zunehmen.

Der Gehalt der Phosphatid-Bromfettsäure in der Leber besteht, wie in Tabelle III(B) angegeben, aus Dibromfettsäure 1,77%, Tetrabromfettsäure 0,84%, Hexabromfettsäure 0,116% und Octabromfettsäure 0,140%. Diese Ergebnisse zeigen im Vergleich mit denen bei normaler Kost beinahe keinen merklichen Unterschied, nur hat die Tetrabromfettsäure etwas zugenommen.

Der Gehalt der Fett-Bromfettsäure im Muskel besteht, wie Tabelle III(C) zeigt, aus Dibromfettsäure 4,46%, Tetrabromfettsäure 0,548%, Hexabromfettsäure 0,524% und Octabromfettsäure 0,030%.

Wenn man nun diese Ergebnisse mit den bei normaler Kost vergleichend betrachtet, so findet man, dass der Gehalt jeder Bromfettsäure ebenfalls zunimmt und deshalb die gesamte Bromfettsäuremenge, welche bei normaler Kost 1,65% beträgt, hier 5,56% zeigt. Es nehmen besonders die Tetra- und Hexabromfettsäure beträchtlich zu, deren Menge bei der ersteren etwa der 10-fachen bei normaler Kost und bei letzterer etwa der 20-fachen Menge entspricht.

Der Gehalt der Phosphatid-Bromfettsäure im Muskel besteht, wie in Tabelle III(D) angegeben, aus Dibromfettsäure 1,19%, Tetrabromfettsäure 0,529%, Hexabromfettsäure 0,102% und Octabromfettsäure 0,147%. Diese Ergebnisse zeigen im Vergleich mit denen bei normaler Kost keinen grossen Unterschied.

Versuch 4.

Es wurde alsdann bei den Tieren, welche mit Kokosöl gefüttert worden waren, die Zusammensetzung der Fett- und Phosphatid-Bromfettsäure in Leber und Muskel ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV(A) zeigt, dass die Fett-Bromfettsäure in der Leber, der aus Dibromfettsäure 4,93%, Tetrabromfettsäure 0,117%, Hexabromfettsäure 0,028% und Octabromfettsäure 0,030% besteht.

TABELLE IV(A). (Leberfett).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fett-säure in %	Dibrom-fettsäure in %	Tetrabrom-fettsäure in %	Hexabrom-fettsäure in %	Octabrom-fettsäure in %
13	Leber gesamt. Br-F. S.	5,456	5,333	0,078	0,028	0,017
		—	97,74	1,42	0,52	0,31
14	Leber gesamt. Br-F. S.	5,708	5,450	0,190	0,020	0,048
		—	95,48	3,33	0,36	0,81
15	Leber gesamt. Br-F. S.	4,163	4,014	0,083	0,036	0,028
		—	96,44	2,01	0,88	0,68
Mittel	Leber gesamt. Br-F. S.	5,109	4,932	0,117	0,028	0,030
		—	96,55	2,25	0,58	0,58

TABELLE IV(B). (Leberphosphatid).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fett-säure in %	Dibrom-fettsäure in %	Tetrabrom-fettsäure in %	Hexabrom-fettsäure in %	Octabrom-fettsäure in %
13	Leber gesamt. Br-F. S.	6,184	5,699	0,224	0,131	0,129
		—	92,14	3,63	2,12	2,09
14	Leber gesamt. Br-F. S.	8,342	7,173	1,545	0,168	0,454
		—	85,88	6,54	2,01	5,44
15	Leber gesamt. Br-F. S.	5,970	5,371	0,263	0,163	0,171
		—	89,92	4,40	2,73	2,88
Mittel	Leber gesamt. Br-F. S.	6,832	6,081	0,345	0,154	0,251
		—	89,31	4,86	2,29	3,46

TABELLE IV(C). (Muskelfett).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fettsäure in %	Dibrom-fettsäure in %	Tetrabrom-fettsäure in %	Hexabrom-fettsäure in %	Octabrom-fettsäure in %
13	Muskel	3,062	2,907	0,123	0,022	0,010
	gesamt. Br-F. S.	—	94,93	4,01	0,71	0,32
14	Muskel	1,844	1,767	0,049	0,016	6,012
	gesamt. Br-F. S.	—	95,88	2,62	0,87	0,64
15	Muskel	2,333	2,296	0,040	0,017	0,030
	gesamt. Br-F. S.	—	96,35	1,67	0,71	1,25
Mittel	Muskel	2,429	2,393	0,070	0,018	0,017
	gesamt. Br-F. S.	—	95,72	2,77	0,76	0,74

TABELLE IV(D). (Muskelposphatid).

Tier-Nr.	Material	gesamte Br-Fettsäure in %	Dibrom-fettsäure in %	Tetrabrom-fettsäure in %	Hexabrom-fettsäure in %	Octabrom-fettsäure in %
13	Muskel	3,418	2,598	0,550	0,091	0,179
	gesamt. Br-F. S.	—	86,01	6,09	2,66	5,23
14	Muskel	2,699	2,370	0,163	0,063	0,103
	gesamt. Br-F. S.	—	87,81	6,04	2,33	3,81
15	Muskel	3,432	2,943	0,225	0,082	0,182
	gesamt. Br-F. S.	—	85,75	6,55	2,39	5,30
Mittel	Muskel	3,183	2,637	0,312	0,078	0,154
	gesamt. Br-F. S.	—	86,52	6,22	2,46	4,78

Verglichen mit den Ergebnissen bei normaler Kost, ist die Menge der Dibromfettsäure und Tetrabromfettsäure etwa 3-fach und die Hexa- und Octabromfettsäure etwa 2-fach grösser. Es wurde also erkannt, dass die gesamte Bromfettsäuremenge im Gegensatz zu 1,53% bei normaler Kost hier 5,10% beträgt.

Da die oben erwähnten Bromfettsäuren alle fast gleichgradig zugenommen haben, zeigt der prozentuale Wert jeder Bromfettsäuremenge gegenüber der gesamten Bromfettsäuremenge mit der-

jenigen bei normaler Kost keinen grossen Unterschied.

Der Gehalt der Phosphatid-Bromfettsäure in der Leber besteht, wie in Tabelle IV (B) angegeben, aus Dibromfettsäure 6,08%, Tetrabromfettsäure 0,345%, Hexabromfettsäure 0,15% und Octabromfettsäure 0,25%. Vergleicht man die Ergebnisse mit denen bei normaler Kost, so ist die Menge der Dibromfettsäure bedeutend höher und entspricht etwa der 3-fachen Menge bei den letzteren. Tetra- und Hexabromfettsäure erfuhren fast keine Mengenschwankungen, und die Octabromfettsäuremenge ist etwa 2-fach höher.

Da wie oben erwähnt, die Menge der Dibromfettsäure eine beträchtliche Zunahme erfährt, zeigte die gesamte Bromfettsäuremenge, welche bei normaler Kost 2,59% betrug, hier 6,8%.

Es ist eine sehr interessante Tatsache, dass es trotz der Fütterung mit Kokosöl, welches von gesättigten Fettsäuren aufgebaut ist, zur Zunahme der Fett- und Phosphatid-Bromfettsäuremenge kommt.

Fernerhin besteht der Gehalt der Fett-Bromfettsäure im Muskel, wie in Tabelle IV (C) angegeben, aus Dibromfettsäure 2,32%, Tetrabromfettsäure 0,070%, Hexabromfettsäure 0,018% und Octabromfettsäure 0,017%. Diese Werte im Vergleich mit denen bei normal gefütterten Tieren zeigen keinen bedeutenden Unterschied.

Der Gehalt der Phosphatid-Bromfettsäure im Muskel besteht, wie in Tabelle IV (D) angegeben, aus Bibromfettsäure 2,63%, Tetrabromfettsäure 0,312%, Hexabromfettsäure 0,078% und Octabromfettsäure 0,154%. Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit denen bei normaler Kost zeigt sich kein merklicher Unterschied.

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND BESPRECHUNG.

1. Versuch an Tauben, die mit normalen Kost gefüttert wurden.

Es wurden die verschiedenen ungesättigten Fettsäuren, welche das Fett und Phosphatid in Leber und Muskel aufbauen, isoliert und ermittelt.

1) Bestimmungsergebnisse bei der Leber.

Die Fett-Bromfettsäuremenge ergibt an Dibromfettsäure 1,63%, Tetrabromfettsäure 0,035%, Hexabromfettsäure 0,015% und

Octabromfettsäure 0,012%.

Die Phosphatid-Bromfettsäuremenge ergibt an Dibromfettsäure 2,06%, Tetrabromfettsäure 0,309%, Hexabromfettsäure 0,111% und Octabromfettsäure 0,112%.

2) Bestimmungsergebnisse beim Muskel.

Die Fett-Bromfettsäuremenge ergibt an Dibromfettsäure 1,56%, Tetrabromfettsäure 0,052%, Hexabromfettsäure 0,025% und Octabromfettsäure 0,015%.

Die Phosphatid-Bromfettsäuremenge ergibt an Dibromfettsäure 1,47%, Tetrabromfettsäure 0,440%, Hexabromfettsäure 0,093% und Octabromfettsäure 0,156%.

3) Die obigen Ergebnisse und die prozentualen Werte jeder Bromfettsäure gegenüber der gesamten Bromfettsäuremenge (Br-F. S.) sind in Tabelle V aufgeführt.

TABELLE V.

Fettsbst.	Material	Dibrom- fettsäure in %	Tetrabrom- fettsäure in %	Hexabrom- fettsäure in %	Octabrom- fettsäure in %
Leberfett	Gewebe gesamt. Br-F. S.	1,634	0,035	0,015	0,012
		95,43	2,36	0,97	0,81
Leber- phosphatid	Gewebe gesamt. Br-F. S.	2,062	0,309	0,111	0,112
		79,66	12,02	4,89	4,98
Muskelfett	Gewebe gesamt. Br-F. S.	1,562	0,052	0,025	0,015
		94,87	3,18	1,56	0,98
Muskel- phosphatid	Gewebe gesamt. Br-F. S.	1,475	0,440	0,093	0,156
		67,03	20,04	4,32	6,98

Wenn man jede ungesättigte Fettsäuremenge auf Grund der obigen Bromfettsäuremenge errechnet, so erhält man die in Tabelle VI verzeichneten Ergebnisse.

Bei Betrachtung der Tabelle VI zeigt sich, dass die Oleinsäure im Leberfett 1,045%, Linolsäure 0,016%, Linolensäure 0,005% und Arachidonsäure 0,003% beträgt. Die Menge der im Phosphatid der Leber enthaltenen Oleinsäure beträgt 1,32%, die der Linolsäure

TABELLE VI.

Gewebe	Fettsubst.	Oleinsäure		Linolsäure		Linolensäure		Arachidonsäure	
		%	Phosphatid Fett	%	Phosphatid Fett	%	Phosphatid Fett	%	Phosphatid Fett
Leber	Fett	1,045		0,0166		0,0055		0,0039	
	Phosphatid	1,320	1,2	0,1466	9,0	0,0426	7,8	0,0364	9,0
	gesamt.	2,365		0,1632		0,0481		0,0403	
Muskel	Fett	1,000		0,0248		0,0095		0,0051	
	Phosphatid	0,9430	0,94	0,2080	8,4	0,0344	3,6	0,0505	10,0
	gesamt.	1,9430		0,2328		0,0439		0,0556	

0,146%, die der Linolensäure 0,042% und die der Arachidonsäure 0,036%. Betrachtet man vergleichend den Gehalt dieser Fettsäuren im Fett und Phosphatid, so findet man, dass die Oleinsäure in beiden in fast gleicher Menge vorhanden ist, während die übrigen ungesättigten Fettsäuren im Phosphatid in bedeutend höherer Menge als im Fett vorhanden sind, indem im ersteren die Linolsäure etwa 9-fach, die Linolensäure etwa 8-fach und die Arachidonsäure etwa 9-fach reichlicher enthalten ist.

Im Muskel zeigt die Oleinsäure 1,94%, Linolsäure 0,232%, Linolensäure 0,043% und Arachidonsäure 0,055%. Die mengenmässige Verteilung der Fettsäuren im Fett und Phosphatid ist bei der Oleinsäure fast gleich gross, und die im Phosphatid vorhandene Menge der übrigen ungesättigten Fettsäuren ist, wie in der Leber, viel höher als die im Fett und zwar bei Linolsäure 8-fach, bei Linolensäure 4-fach und bei Arachidonsäure 10-fach höher.

5) Den prozentualen Wert jeder ungesättigten Fettsäuremenge gegenüber der gesamten ungesättigten Fettsäuremenge zeigt Tabelle VII.

Die Menge der hochungesättigten Fettsäure ist im Leberfett, wie aus Tabelle VII zu ersehen, gering und zeigt an Linolsäure 1,77%, sie ist an Linolen- und Arachidonsäure noch geringer, je 0,56% und 0,43% ergebend; der prozentuale Wert jeder ungesättigten Fettsäure im Leberphosphatid zeigt an Linolsäure 9,42%, Linolensäure 2,63% und Arachidonsäure 2,70%. Hiernach wurde

TABELLE VII.

Gewebe	Fettsubst.	Olein- säure	Linolsäure		Linolensäure		Arachidonsäure	
		%	%	Phosphatid	%	Phosphatid	%	Phosphatid
				Fett		Fett		Fett
Leber	Fett	97,24	1,77	8,5	0,56	4,7	0,43	5,3
	Phosphatid	85,25	9,42		2,63		2,70	
Muskel	Fett	96,22	2,38	8,0	0,89	3,0	0,51	8,0
	Phosphatid	76,20	17,00		2,76		4,04	

erkannt, dass die Menge der hochungsättigten Fettsäure im Phosphatid einen viel höheren Prozentsatz zeigt als diejenige im Fett.

Die Menge der ungesättigten Fettsäure im Muskelfett ergibt, wie Tabelle VII zeigt, an Oleinsäure 96,22%, Linolsäure 2,38%, Linolensäure 0,89% und Arachidonsäure 0,51%. Der prozentuale Wert der ungesättigten Fettsäure im Muskelphosphatid zeigt an Linolsäure 17,0%, Linolensäure 2,76% und Arachidonsäure 4,04%. Wie in der Leber ist auch im Muskel der Prozentsatz der hochungsättigten Fettsäure gegenüber der gesamten ungesättigten Fettsäuremenge im Phosphatid viel höher als im Fett.

6) Vergleicht man nun den Gehalt der das Leber- und Muskelfett aufbauenden verschiedenen ungesättigten Fettsäuren, so findet man, dass er bei allen Fettsäuren fast gleich ist. Bei Vergleich des Gehaltes der das Leber- und Muskelphosphatid aufbauenden verschiedenen Fettsäuren zeigt sich, dass die Linolsäure immer dazu neigt, im Muskelphosphatid viel reichlicher als im Leberphosphatid enthalten zu sein. Betrachtet man Tabelle VII, so treten diese Verhältnisse noch deutlicher hervor, und zwar findet man, dass der Prozentsatz jeder im Fett vorhandenen ungesättigten Fettsäuremenge gegenüber der gesamten ungesättigten Fettsäuremenge sich in Leber und Muskel fast gleich verhält, während beim Phosphatid der prozentuale Wert der Linolsäure in der Leber 9,42%, hingegen im Muskel 17,00% beträgt. Es ist eine interessante Tatsache, dass in den Muskeln die Phosphatid-Linolsäure in hoher Menge vorhanden ist.

2. *Versuche an Tauben, die mit Olivenöldiät gefüttert wurden.*

1) Bestimmungsergebnisse bei der Leber.

Die Menge der in der Leber vorhandenen verschiedenen Fett-Bromfettsäuren zeigt sich nur etwas höher als die der mit normaler Kost gefütterten Tauben. Die Menge der Phosphatid-Bromfettsäure in der Leber ergibt nur an der Tetrabromfettsäure einen höheren Prozentsatz als bei normaler Kost, die übrigen Bromfettsäuren verhalten sich bei beiden Fütterungen nahezu gleich.

2) Bestimmungsergebnisse beim Muskel.

Der Gehalt der Fett-Bromfettsäure im Muskel zeigt nur eine geringe Zunahme im Vergleich mit dem bei normaler Kost. Der Gehalt der Phosphatid-Bromfettsäure ist beinahe gleich dem bei normaler Kost.

TABELLE VIII.

Gewebe	Fettsubst.	Olein- säure	Linolsäure		Linolensäure		Arachidonsäure	
		%	%	$\frac{\text{Phosphatid}}{\text{Fett}}$	%	$\frac{\text{Phosphatid}}{\text{Fett}}$	%	$\frac{\text{Phosphatid}}{\text{Fett}}$
Leber	Fett	1,48	0,042		0,0067		0,0063	
	Phosphatid	1,11	0,296	7,0	0,0355	5,3	0,0435	7,0
	gesamt.	2,59	0,338		0,0422		0,0498	
Muskel	Fett	1,23	0,069		0,0057		0,0082	
	Phosphatid	0,76	0,202	3,0	0,0308	5,4	0,0458	5,6
	gesamt.	1,99	0,271		0,0365		0,0540	

TABELLE IX.

Gewebe	Fettsubst.	Olein- säure	Linolsäure		Linolensäure		Arachidonsäure	
		%	%	$\frac{\text{Phosphatid}}{\text{Fett}}$	%	$\frac{\text{Phosphatid}}{\text{Fett}}$	%	$\frac{\text{Phosphatid}}{\text{Fett}}$
Leber	Fett	96,46	2,66		0,44		0,44	
	Phosphatid	75,54	19,22	7,0	2,21	5,0	2,95	7,0
Muskel	Fett	93,73	5,22		0,42		0,63	
	Phosphatid	73,40	19,20	4,0	3,00	7,0	4,40	7,0

Wenn man jede ungesättigte Fettsäuremenge auf Grund der Bromfettsäuremenge errechnet, so erhält man die in Tabelle VIII verzeichneten Ergebnisse.

Den prozentualen Wert jeder ungesättigten Fettsäuremenge gegenüber der gesamten ungesättigten Fettsäuremenge zeigt Tabelle IX.

3. Versuche an Tauben, die mit Leinöldiät gefüttert wurden.

1) Bestimmungsergebnisse bei der Leber.

Die Fett-Bromfettsäuremenge besteht aus Dibromfettsäure 1,29%, Tetrabromfettsäure 0,308%, Hexabromfettsäure 0,111% und Octabromfettsäure 0,014%. Die Menge der Phosphatid-Bromfettsäure besteht aus Dibromfettsäure 1,77%, Tetrabromfettsäure 0,841%, Hexabromfettsäure 0,116% und Octabromfettsäure 0,140%.

2) Bestimmungsergebnisse beim Muskel.

Die Fett-Bromfettsäuremenge ergibt an Dibromfettsäure 4,46%, Tetrabromfettsäure 0,548%, Hexabromfettsäure 0,524% und Octabromfettsäure 0,030%. Die Menge der Phosphatid-Bromfettsäure ergibt an Dibromfettsäure 1,19%, Tetrabromfettsäure 0,527%, Hexabromfettsäure 0,102% und Octabromfettsäure 0,147%.

3) Die obigen Ergebnisse und den Prozentsatz der verschiedenen ungesättigten Bromfettsäuremengen gegenüber der

TABELLE X.

Fettsubst.	Material	Dibrom- fettsäure in %	Tetrabrom- fettsäure in %	Hexabrom- fettsäure in %	Octabrom- fettsäure in %
Leberfett	Gewebe	1,291	0,308	0,111	0,014
	gesamt. Br-F. S.	75,29	18,49	6,31	0,83
Leber- phosphatid	Gewebe	1,778	0,841	0,116	0,140
	gesamt. Br-F. S.	64,74	29,35	4,02	4,87
Muskelfett	Gewebe	4,468	0,548	0,524	0,0305
	gesamt. Br-F. S.	81,11	9,72	9,42	0,38
Muskel- phosphatid	Gewebe	1,198	0,527	0,102	0,147
	gesamt. Br-F. S.	60,81	26,67	5,13	7,38

gesamten Bromfettsäuremenge zeigt Tabelle X.

4) Die Ergebnisse der Errechnung der verschiedenen ungesättigten Fettsäuren der obigen Bromfettsäuremenge sind in Tabelle XI zusammengestellt.

TABELLE XI.

Gewebe	Fettsubst.	Olein- säure	Linolsäure		Linolensäure		Arachidonsäure	
		%	%	Phosphatid Fett	%	Phosphatid Fett	%	Phosphatid Fett
Leber	Fett	0,825	0,178		0,0408		0,0048	
	Phosphatid	1,135	0,394	2,2	0,0427	1,0	0,0455	9,5
	gesamt.	1,960	0,572		0,0835		0,0503	
Muskel	Fett	2,860	0,257		0,1920		0,0099	
	Phosphatid	0,767	0,248	1,0	0,0372	0,2	0,0478	4,8
	gesamt.	3,627	0,505		0,2292		0,0575	

Nach den Ergebnissen in Tabelle XI sind die Mengen der im Fett der Leber enthaltenen ungesättigten Fettsäuren an Oleinsäure 0,825%, Linolsäure 0,178%, Linolensäure 0,040% und Arachidonsäure 0,0048%. Vergleicht man sie mit derjenigen bei normaler Kost, so zeigt sich die Menge der Linol- und Linolensäure etwa 8-fach grösser als bei der letzteren. Die verschiedenen ungesättigten Fettsäuremengen im Phosphatid ergeben im Vergleich mit denjenigen bei normaler Kost an Linolsäure eine etwa 2-fache Menge, während die übrigen Fettsäuren sich beinahe gleich verhalten. Bei normaler Fütterung, wie schon erwähnt wurde, sind die Linol- und Linolensäure in einer viel höheren Menge im Phosphatid als im Fett vorhanden, während in diesem Falle die Menge der beiden Fettsäuren im Fett beträchtlich zunimmt, so dass sie von derjenigen im Phosphatid kaum verschieden ist.

Die Menge der im Fett des Muskels enthaltenen Oleinsäure beträgt 2,86%, die der Linolsäure 0,257%, die der Linolensäure 0,192% und die der Arachidonsäure 0,0099%. Beim Vergleich mit den Mengen bei normaler Kost zeigt die Oleinsäure nur geringe Zunahme, während die Linolsäure eine etwa 10-fach und die

Linolensäure eine etwa 20-fach höhere Menge ergibt. Indes sind die verschiedenen ungesättigten Fettsäuremengen im Phosphatid von den bei normaler Kost kaum verschieden. Die Linol- und Linolensäure weisen bei normaler Kost, wie schon erwähnt wurde, im Phosphatid eine viel höhere Menge als im Fett auf. Jedoch ist hier die Menge der Linolsäure im Fett mit der im Phosphatid beinahe gleich, und die Linolensäuremenge im Fett ist im Vergleich mit der im Phosphatid 5-fach höher. Das beruht darauf, dass wegen der Fütterung mit dem an Linol- und Linolensäure reichen Leinöl das Gewebefett stark beeinflusst wurde. Auch in solchem Falle wird das Phosphatid im Vergleich mit dem Fett verhältnismässig wenig beeinflusst. Dieses Verhältnis wird noch verständlicher, wenn man Tabelle XII betrachtet.

TABELLE XII.

Gewebe	Fettsubst.	Oleinsäure	Linolsäure		Linolensäure		Arachidonsäure	
		%	%	Phosphatid Fett	%	Phosphatid Fett	%	Phosphatid Fett
Leber	Fett	81,02	14,60	1,5	3,92	0,8	0,46	6
	Phosphatid	71,16	23,60		2,54		2,70	
Muskel	Fett	86,45	7,59	3	5,76	0,6	0,21	20
	Phosphatid	69,92	22,40		3,38		4,30	

Tabelle XII zeigt den prozentualen Wert der verschiedenen ungesättigten Fettsäuren gegenüber der gesamten ungesättigten Fettsäuremenge im Fett und Phosphatid. Hieraus geht hervor, dass die Fett-Linolsäure in der Leber, welche den normalen Wert von 1,77% zeigt, 14,60% ergibt also etwa 8-fach höher als der normale Wert ist, und die Fett-Linolensäure, den normalen Wert von 0,56% zeigend, 3,92% ergibt und etwa 7-fach höher ist. Die Phosphatid-Linolsäure der Leber, welche den normalen Wert von 9,42% zeigt, ergibt 23,60% und ist etwa 2,5-fach höher als der normale Wert. Hiernach wird bei Leinölfütterung das Fett und Phosphatid in der Leber beeinflusst, besonders ist der Einfluss auf das erstere gross.

Die Fett-Linolsäure im Muskel ergibt 7,59% und ist im Vergleich mit dem normalen Wert 3-fach höher. Die Fett-Linolensäure ergibt 5,76% und ist 5-fach höher als der normale Wert. Die Phosphatid-Linolsäure ergibt 22,4% und die Linolensäure 3,38%, sie sind im Vergleich mit dem normalen Wert nur wenig höher. Diese Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass der Einfluss der Leinöldiät auf das Muskelfett grösser als der auf das Muskelphosphatid ist.

4. Versuche an Tauben, die mit Kokosöl gefüttert wurden.

1) Bestimmungsergebnisse bei der Leber.

Die Fett-Bromfettsäuremenge besteht aus Dibromfettsäure 4,93%, Tetrabromfettsäure 0,117%, Hexabromfettsäure 0,028% und Octabromfettsäure 0,030%. Die Phosphatid-Bromfettsäuremenge ergibt an Dibromfettsäure 6,08%, Tetrabromfettsäure 0,345%, Hexabromfettsäure 0,154% und Octabromfettsäure 0,251%.

2) Bestimmungsergebnisse beim Muskel. Die Fett-Bromfettsäuremenge besteht aus Dibromfettsäure 2,32%, Tetrabromfettsäure 0,070%, Hexabromfettsäure 0,018% und Octabromfettsäure 0,017%. Die Menge der Phosphatid-Bromfettsäure ergibt an Dibromfettsäure 2,63%, Tetrabromfettsäure 0,312%, Hexabromfettsäure 0,078% und Octabromfettsäure 0,154%.

TABELLE XIII.

Fettsubst.	Material	Dibrom- fettsäure in %	Tetrabrom- fettsäure in %	Hexabrom- fettsäure in %	Octabrom- fettsäure in %
Leberfett	Gewebe	4,932	0,117	0,028	0,030
	gesamt. Br-F. S.	96,55	2,25	0,58	0,58
Leber- phosphatid	Gewebe	6,081	0,345	0,154	0,251
	gesamt. Br-F. S.	89,31	4,86	2,29	3,46
Muskelfett	Gewebe	2,323	0,070	0,018	0,017
	gesamt. Br-F. S.	95,72	2,77	0,76	0,74
Muskel- phosphatid	Gewebe	2,637	0,312	0,078	0,154
	gesamt. Br-F. S.	86,52	6,22	2,46	4,78

3) Die obigen Ergebnisse und die Prozente der verschiedenen Bromfettsäuremengen gegenüber der gesamten Bromfettsäuremenge sind in Tabelle XIII aufgeführt.

4) Wenn man die verschiedenen ungesättigten Fettsäuremengen nach den Ergebnissen in Tabelle XII errechnet, so erhält man die in Tabelle XIV und XV wiedergegebenen Zahlen.

TABELLE XIV.

Gewebe	Fettsubst.	Olein- säure	Linölsäure		Linolensäure		Arachidonsäure	
		%	%	Phosphatid Fett	%	Phosphatid Fett	%	Phosphatid Fett
Leber	Fett	3,15	0,055		0,0105		0,0100	
	Phosphatid	3,89	0,162	3,0	0,0566	5,4	0,0815	8,1
	gesamt.	7,04	0,217		0,0671		0,0915	
Muskel	Fett	1,48	0,033		0,0672		0,0056	
	Phosphatid	1,68	0,146	4,4	0,0289	0,4	0,0493	9
	gesamt.	3,16	0,179		0,0961		0,0549	

TABELLE XV.

Gewebe	Fettsubst.	Olein- säure	Linölsäure		Linolensäure		Arachidonsäure	
		%	%	Phosphatid Fett	%	Phosphatid Fett	%	Phosphatid Fett
Leber	Fett	97,63	1,68	2,0	0,395	4	2,97	0,6
	Phosphatid	93,31	3,32		1,530		1,86	
Muskel	Fett	97,12	2,06	2,3	0,443	3,4	0,38	7,0
	Phosphatid	91,16	4,82		1,500		2,56	

Nach den Ergebnissen in Tabelle XIV zeigt die Menge der im Fett der Leber vorhandenen Öleinsäure 3,15%, die der Linölsäure 0,055%, die der Linolensäure 0,010% und die der Arachidonsäure 0,010%. Wenn man sie mit denjenigen bei normaler Kost vergleicht, so ergibt sich, dass die Menge der Öleinsäure und Linölsäure etwa 3-fach und die der Linolen- und Arachidonsäure etwa 2-fach

grösser als bei normaler Kost ist. Die Menge der Oleinsäure im Phosphatid beträgt 3,89%, die der Linolsäure 0,162%, die der Linolensäure 0,056% und die der Arachidonsäure 0,085%. Im Vergleich mit der Menge bei normaler Kost ist die Menge der Oleinsäure etwa 3-fach höher, während die übrigen Fettsäuremengen im Vergleich mit denen bei normalen Kost keinen grossen Unterschied erkennen lassen.

Diese Ergebnisse zeigen die bemerkenswerte Tatsache, dass auch bei Fütterung mit Kokosöl, welches aus gesättigter Fettsäure besteht, die ungesättigte Fettsäure des Leber-Fettes und die Oleinsäure des Leber-Phosphatides in höherer Menge vorhanden sind. Die Zunahme der Phosphatid-Oleinsäure wird auch daraus ersichtlich, dass in Tabelle XV die Menge dieser Oleinsäure in ungesättigter Phosphatidfettsäure einen Wert von 93% (normaler Wert 85%) zeigt.

5) Die Menge der im Fett des Muskels enthaltenen Oleinsäure beträgt 1,48%, die der Linolsäure 0,033%, die der Linolensäure 0,067% und die der Arachidonsäure 0,0056%. Im Vergleich mit der Menge bei normaler Kost ist also kein grosser Unterschied zu erkennen. Die Menge der im Phosphatid enthaltenen Oleinsäure ergibt 1,68%, die der Linolsäure 0,146%, die der Linolensäure 0,028% und die der Arachidonsäure 0,049%, was bedeutet, dass die Menge der Oleinsäure etwa 2-fach höher ist als die bei normaler Kost, während die der übrigen Fettsäure beinahe unverändert bleibt. Die Zunahme der Phosphatid-Oleinsäure kann man aus Tabelle XIV erkennen, dort beträgt die Menge dieser Fettsäure in der gesamten ungesättigten Phosphatid-Fettsäure 91%, während der normale Wert 76% zeigt.

6) Durch die obigen Ergebnissen wurde nachgewiesen, dass die ungesättigte Fettsäuremenge im Fett und Phosphatid im Tierkörper bei Fütterung mit dem aus gesättigten Fettsäure bestehenden Kokosöl zunimmt. Besonders in der Leber nimmt die Oleinsäure des Fettes und Phosphatids an Menge bedeutend zu, und auch im Muskel erfährt die Phosphatid-Oleinsäure eine beträchtliche Zunahme.

Longenecker (1939) fand bei der Fütterung von Ratten mit

einer Kokosöl reichlich enthaltenden Diät, dass in Depotfett der Ratte C_{14} - und C_{16} -ungesättigte Fettsäure enthalten sind. Daraus kann man erkennen, dass die Laurin- und Myristinsäure in ungesättigte Fettsäuren umgewandelt wurden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Zunahme der Fraktion der Oleinsäure wahrgenommen, was auf die Bildung der C_{14} - und C_{16} -ungesättigten Fettsäure zurückzuführen sei.

SCHLUSS.

1) Was die Menge der verschiedenen ungesättigten Fettsäuren, welche das Fett der mit normalen Diät gefütterten Tauben aufbauen, anbetrifft, so beträgt in der Leber die Oleinsäure 1,045%, Linolsäure 0,016%, die Linolensäure 0,0055% und die Arachidonsäure 0,0039%.

Die Menge der das Phosphatid aufbauenden ungesättigten Fettsäuren beträgt in der Leber bei Oleinsäure 1,320%, bei Linolsäure 0,146%, bei Linolensäure 0,042% und bei Arachidonsäure 0,0364%.

Die Menge der das Fett aufbauenden ungesättigten Fettsäuren beläuft sich in Muskeln bei Oleinsäure auf 1,000%, bei Linolsäure auf 0,0248%, bei Linolensäure auf 0,0095% und bei Arachidonsäure auf 0,0051%.

Die Menge der das Phosphatid aufbauenden ungesättigten Fettsäuren ist in Muskeln bei Oleinsäure 0,943%, bei Linolsäure 0,208%, bei Linolensäure 0,0344% und bei Arachidonsäure 0,0505%.

Aus obigen Ergebnissen geht hervor, dass in der Leber die Oleinsäure im Fett und Phosphatid in etwa gleicher Menge enthalten ist, während die übrigen ungesättigten Fettsäuren viel reichlicher im Phosphatid enthalten sind als im Fett, so ist der Gehalt der Linolsäure im Phosphatid etwa 9-fach, der der Linolensäure etwa 8-fach und der der Arachidonsäure etwa 9-fach im Vergleich mit dem im Fett.

Auch in Muskeln ist die Oleinsäure fast in gleicher Menge im Fett und Phosphatid enthalten, aber die übrigen Fettsäuren sind ebenso reichlicher im Phosphatid enthalten als im Fett; so ist die Linolsäure im Phosphatid in etwa 8-facher, die Linolensäure in etwa

4-facher und die Arachidonsäure in etwa 10-facher Menge im Vergleich mit ihrem Gehalt im Fett enthalten.

II) Der Gehalt der das Fett und Phosphatid aufbauenden ungesättigten Fettsäuren in Leber und Muskeln der Tauben, welche mit Olivenöldiät gefüttert wurden, ist gleich dem bei normalen Diät.

III) Bei den mit Leinöldiät gefütterten Tauben nimmt der Gehalt der Linol- und Linolensäure im Leber- und Muskelfett in hohem Masse zu. Diese Zunahme ist viel grösser als die der beiden Fettsäuren im Leber- und Muskelphosphatid. Diese Erscheinung ist durch den Einfluss der Leinöldiät, welche die beiden Fettsäuren reichlich enthält, bedingt. Daher kann man sagen, dass das Gewebefett durch Fettdiät viel stärker beeinflusst wird als das Gewebephosphatid.

IV) Bei den mit Kokosöldiät gefütterten Tauben nimmt die Menge der Oleinsäure in Leberfett und -Phosphatid sowie im Muskelphosphatid in höherem Masse zu als bei der normalen Diät. Dies spricht dafür, dass im Tierkörper die gesättigte Fettsäure in die ungesättigte umgewandelt werden kann.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Dr. Y. Sueyoshi für seine Anregung u. Anleitung bei dieser Arbeit meinen besten Dank aus.

LITERATUR.

- Klenk (1930): Z. Physiol. Chem. **192**, 217; (1930): ebenda **194**, 191;
(1935): ebenda **232**, 54.
Klenk u. Schoenebeck (1932): ebenda **209**, 112.
Klenk u. Ditt (1934): ebenda **226**, 213.
Longenecker (1939): J. Biol. Chem. **130**, 167.
Miura (1939): J. Biochem. **29**, 467.
Sueyoshi u. Tooyama (1942): J. Biochem. **35**, 1.

DIE MIKROBESTIMMUNGSMETHODE DES HISTIDINS IM HARN.

VON

YOSHIO OYAMADA.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 11. März 1942.)

Erhitzt man eine wässrige Lösung des Histidins oder seiner Salze, die vorher mit ein wenig überschüssigem Bromwasser gerade bis zum Bestehenbleiben der Gelbfärbung versetzt worden ist, so färbt sie sich allmählich dunkel weinrot, um schliesslich schwarze Niederschläge abzuscheiden, die die Lösung schmutzig trüben. Dies ist die originelle Histidinreaktion von Knoop (1908). Hunter (1922) konnte durch vorherige Chloroformextraktion des überschüssigen Broms die Empfindlichkeit der Knoopschen Reaktion um das Zehnfache steigern. Er hat dabei auch beobachtet, dass die bromierte Histidinlösung, falls sie mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und erhitzt wird, schnell eine tiefviolette Färbung annimmt. Diesen Befund in Betracht ziehend hat Kapeller-Adler (1933) die Bedingungen der Bromreaktion festgelegt und eine neue Histidinbestimmungsmethode ausgearbeitet. Da sie aber bei der Ausführung dieser Methodik mit Harn einen störenden Einfluss von Harnphosphat bemerkt hat, so hat sie den Harn zunächst durch gesättigte Barytlösung von Phosphat befreit. Nach Einengen der Lösung wurde das Histidin mit Hopkinschem Reagenz in alkoholisch-ätherischem Medium gefällt, in Salzsäure gelöst, durch Schwefelwasserstoff entquecksilbert und dann kolorimetrisch gemessen. Sera (1939) hat dem Harn Barytlösung zugesetzt, um das Phosphat zu entfernen und hat dann mit verdünnter Schwefelsäure und Tierkohle überschüssiges Barium sowie Harnfarbstoffe beseitigt. Er hat ausserdem sinnige Erfindungen für die Histidinbestimmung gemacht. Das überschüssige Brom wurde nämlich

mittels Ammoniumrhodanid reduziert, die Azidität der farblosen Lösung durch Ammoniumazetat zu $\text{pH } 5$ gemässigt, die Lösung 7 Minuten auf 50° erwärmt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen, um die violettrote Verfärbung zu Ende zu führen. Nach ihm ist der betreffende Farbstoff durch Amylalkohol extrahierbar, so dass dieser Auszug ohne Beeinträchtigung durch die von Tyrosin u. a. herrührenden Farbstoffe zur Kolorimetrie angewendet werden kann. Niendorf (1939) hat zur Adsorption des Harnhistidins eine mit Schwefelwasserstoff inaktivierte Knochenkohle gebraucht, das Histidin mittels etwa 30% Essigsäure eluiert und das Eluat eingengt, um es zur kolorimetrischen Bestimmung nach der Methode von Kappeler-Adler zu verwenden. Langley (1941) hat zur Beseitigung der Harnfarbstoffe den mit Schwefelsäure gesäuerten Harn mit Kaliumpermanganat und mit einer durch Säure ausgewaschenen aktiven Kohle behandelt, zum Bromieren des so entfärbten Harns Brom-Tetrachlorkohlenstofflösung gebraucht und die bromierte Lösung mit Natriumacetat auf $\text{pH } 4,6$ gebracht, um dann auf 100° zu erhitzen. Aus dem hiesigen Institut hat Kurihara (1939) eine kolorimetrische Mikrobestimmungsmethode des Histidins mitgeteilt. Das dadurch messbare Histidin konnte dann von Sakaguchi (1940) in 86% Ausbeute als Difflavianat aus dem normalen Menschenharn isoliert werden. Es war die *l*-Form. Die im Harn als Histidin kolorimetrisch gemessene Substanz konnte ausserdem durch Leberhistidase vollständig abgebaut werden. Racker (1941) hat kürzlich beobachtet, dass sich die Harnsubstanz in der nach dem Silber-Baryt-Verfahren gewonnenen Histidinfraktion gegen Leberferment sowie *Bact. coli* in ganz gleicher Weise wie *l*-Histidin verhält, und damit die Angabe von Sakaguchi bestätigt.

Beim Fortführen der Kuriharaschen Methodik zur Messung des Harnhistidingehaltes hat Verfasser aber zuweilen beobachtet, dass die dem Histidin eigentümliche Blaufärbung der zu kolorimetrierenden alkalischen Lösung, obwohl in geringem Grade, doch deutlich rötlich mischgefärbt vorkam. Um diese unangenehme Erscheinung vollständig auszuschalten, hat Verfasser unter Leitung von Prof. Akamatsu die Verbesserung der Methodik von Kuri-

hara unternommen. Die Methodik konnte an sich ausserdem durch Vertiefung der blauen Verfärbung der alkalischen Lösung verfeinert und weiter durch Verwendung des Pulfrichphotometers die genaue Bestimmung einer minimalen Histidinmenge noch möglich gemacht werden.

Kurihara verfuhr folgenderweise: Die durch Trichloressigsäurezusatz angesäuerte Histidinlösung wird bromiert, von überschüssigem Brom durch Chloroformextraktion befreit, dann mit Essigsäure-ammoniumazetat zu $\text{pH } 5$ gepuffert und nach Zyanidzusatz bei Zimmertemperatur 25–30 Minuten stehen gelassen. Die dabei sich rosaviolett verfärbende Lösung wird mit Kalilauge stark alkalisch gemacht, um die dadurch in schönes Blau umgeschlagene Farbe zur Kolorimetrie zu gebrauchen. Verfasser hat bei gründlicher Nachprüfung des Kuriharaschen Verfahrens zuerst zur Verfeinerung der Bromreaktion als vorteilhaft erkannt, die zu bromierende Histidinlösung mit Salzsäure, Schwefelsäure noch zweckmässiger mit Phosphorsäure anstatt mit Trichloressigsäure anzusäuern. Falls Phosphorsäuren verwendet wird, ist es ausserdem unnötig, das Chloroform, das zum Entfernen der überschüssigen Broms gebraucht wird, vorher mit Trichloressigsäure zu versetzen. Die Histidinlösung zur Herstellung der Vergleichslösung für die Kolorimetrie mittels des Dubosqueschen Apparats wird demgemäss wie folgend bereitet: 1.0 ccm $M/40$ Histidinmonochlorid wird in einen 25 ccm Messkolben einpipettiert und $M/10$ Phosphorsäure bis zur Marklinie zugefüllt. Die Konzentration des Histidins ist also $M/1000$. Der Histidingehalt in 5 ccm dieser Lösung ist im Vergleich mit dem in 1 ccm $M/160$ Histidin-Trichloressigsäurelösung bei Kurihara ein wenig geringer, aber die blaue Verfärbung vertieft sich auf das Anderthalbfache. Dann hat Verfasser das Entfernen der chromogenen Substanzen, die das Ausführen der Histidinbestimmung im Harn stören, aufs neue in verschiedener Weise probiert. Wir haben früher den Harn zuerst mit alkalischem Phosphat und aktiver Kohle, die mit Salzsäure ausgewaschen worden war, behandelt, um das Entfärben und das Entfernen der Erdalkalimetalle gleichzeitig auszuführen. Das im Filtrat vorhandene Histidin wurde dann mit Hinsberg'schem Reagenz und Borax

gefällt, das abzentrifugierte Quecksilbersalz in Trichloressigsäure gelöst, durch Einwerfen eines Körnchens Natriumsulfid entquecksilbert und die abfiltrierte wasserklare Lösung dann zum Bromieren gebraucht. Dieses Verfahren hatte aber den Nachteil, dass die Entfernung der chromogenen Harnsubstanzen ab und zu nicht vollständig war, obwohl die kolorimetrische Bestimmung dadurch nicht stark beeinträchtigt wurde. Das neue Verfahren wurde aus folgender Erwägung ausgeführt. Die Harnfarbstoffe, besonders die chromogenen Substanzen können in saurer Reaktion durch Quecksilber gefällt werden. Vorherige Entfernung des Harnkalziums ist für die nachherige Kolorimetrie in alkalischer Reaktion sehr zweckmässig. Daher hat der Verfasser bei der Entfernung der chromogenen Substanzen in saurer Reaktion die gleichzeitige Beseitigung des Kalziums durch Oxalatzusatz ausgeführt. Die Zeit bis zur flockigen Ausfällung des Histidinquecksilbersalzes durch das Hinsbergsche Reagenz wird beim Gebrauch des Natriumkarbonatbikarbonatgemisches anstatt der Boraxlösung stark verkürzt. Ausserdem wurde, wie unten angegeben, eine kleine Verbesserung in einigen Punkten gemacht. Das Harnhistidin konnte nun kolorimetrisch genau gemessen werden. Bei Verwendung des Pulfrichphotometers wurde der Messbereich des Histidins stark verbreitert und das dem Harn zugesetzte Histidin von sehr kleinen Mengen konnte auch quantitativ wiedergefunden werden.

EXPERIMENTELLER TEIL.

1. *Kolorimetrische Histidinbestimmung.*

Erforderliche Lösungen:

- 1) *M*/10 Phosphorsäure.
- 2) Chloroform-Bromlösung: 5 cem Brom + 95 cem Chloroform.
- 3) Chloroform.
- 4) 0,6 g/dl Kaliumcyanid.
- 5) Glycerin: 2 Teile Glycerin werden mit 1 Teil Wasser gemischt.
- 6) Alkali-Cyanlösung: 100 cem 65 g/dl KOH werden mit 2 g KCN versetzt.
- 7) Essigsäure-Ammoniumacetat-Gemisch; 22 cem Eisessig werden

unter Eiskühlung mit etwa 11 ccm konzentriertem Ammoniak versetzt, bis das Gemisch gegen Bromkresolgrünpapier pH von 4,6 zeigt, und mit Wasser auf 40 ccm verdünnt.

- 8) Standardlösung: 1,0 ccm $M/40$ Histidin-monochlorid wird mit $M/10$ Phosphorsäure bis zu 25,0 ccm verdünnt. 5 ccm dieser Lösung enthalten 0,78 mg Histidin.

Erforderliche Apparate:

- 1) Dubosque-Kolorimeter.
- 2) 10 ccm Messzylinder mit Glasstöpsel.
- 3) Kleine Scheidentrichter von ungefähr 15 ccm Inhalt mit Glasstöpsel.
- 4) 25 ccm Messkolben.

Ausführung:

A) Allgemeines Verfahren und Herstellung der Vergleichslösung.

- 1) Bromierung: 7–8 ccm Standardlösung werden in Scheidentrichter genommen, mit 0,5 ccm Bromchloroform versetzt, ein paar Sekunden stark geschüttelt und ca. 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die gelblich gefärbte wässrige Schicht wird durch 2 maliges Ausschütteln mit je 3 ccm Chloroform vom Brom befreit und durch trocknes Papier filtriert.
- 2) Farbenentwicklung: 5,0 ccm Filtrat werden in 10 ccm Messzylinder einpipettiert, mit 1 ccm Essigsäure-Ammoniumacetat-Lösung gemischt, dann wird mit 0,6 g/dl Cyanidlösung bis zur 7 ccm Marklinie aufgefüllt, wieder gut gemischt und bei Zimmertemperatur 25 Minuten stehen gelassen. Die Lösung färbt sich violettrot.
- 3) Alkalisierung: Der Inhalt des Messzylinders wird mit verdünntem Glycerin auf 8,5 ccm Marklinie gefüllt, gut gemischt, dann mit Cyanid-Kalilauge auf 10,0 ccm gefüllt und wieder gut gemischt. Die violettrote Farbe der Lösung schlägt bei dieser Alkalisierung in schönes Blau um.

B) Bestimmung des Harnhistidins.

Erforderliche Reagenzien:

- 1) Indikatoren: a) 0,01% Methylorange in Wasser.

b) 1 g/dl Phenolphthalein in Alkohol.

- 2) 10% Kaliumoxalat.
- 3) 5N Salzsäure.
- 4) Gesättigte Sublimatlösung.
- 5) Aktive Kohle.
- 6) Natriumchlorid.
- 7) Quecksilberlösung von Hinsberg: 150 ccm gesättigte Sublimatlösung werden mit 70 g krystallisiertem Natriumazetat und 10 g Natriumchlorid versetzt.
- 8) Bikarbonat-Karbonat-Gemisch: 100 ccm 6% Natriumbikarbonat werden mit 10 g Natriumkarbonat versetzt.
- 9) 10% Kochsalzlösung.
- 10) 25 g/dl Natriumsulfid.
- 11) 2N Salzsäure.

Ausführung:

20 ccm Harn werden im Messzylinder mit 1 Tropfen Methylorange und 1 ccm Oxalatlösung versetzt, mit 5N Salzsäure gegen den Indikator deutlich sauer gemacht, mit 1 ccm gesättigter Sublimatlösung versetzt, mit Wasser bis zu 25 ccm aufgefüllt, mit 0,2 g aktiver Kohle gut gemischt und filtriert. 10 ccm des wasserklaren Filtrats werden im graduierten Zentrifugenrohr mit 1 g Kochsalz, 1 ccm Hinsberg-Reagenz und 1 Tropfen Phenolphthalein gemischt und mit Bikarbonat-Karbonat alkalisch gemacht, bis sich die Lösung deutlich rötlich verfärbt. Nach einigen Minuten wird der flockige Niederschlag durch Zentrifugieren gesammelt, mit etwa 5 ccm 10% Kochsalzlösung umgerührt und nochmals zentrifugiert. Der Bodensatz wird in 4–5 ccm $M/10$ Phosphorsäure gelöst, darin zuerst unter Tropfenzählung Natriumsulfidlösung, bis das nun schwärzlich gewordene Gemisch deutlich nach Schwefelwasserstoff riecht, und dann dieselben Tropfen 2N Salzsäure zugesetzt, mit $M/10$ Phosphorsäure bis zur 10 ccm Marklinie gefüllt und durch trocknes Filterpapier filtriert. 5 ccm dieses klaren farblosen Filtrates entspricht 4 ccm Harn. 7–8 ccm Filtrat werden in einen kleinen Scheidentrichter genommen und in oben erwähneter Weise bromiert, entbromiert, filtriert und weiter in ganz gleicher Weise wie bei der

Standardlösung behandelt.

- c) Berechnung: Da das kolorimetrisch gemessene Histidin sich auf 4 ccm Harn bezieht, wird der %-Gehalt des Harnhistidins daraus berechnet.
- d) Ergebnis: Verwendet wurde Harn der Kollegen im hiesigen Institut. Ausser der Bestimmung des Histidingehalts wurde bei jedem Harn die quantitative Analyse des zugesetzten Histidins ausgeführt. 20 ccm Harn wurden nämlich in Messzylinder mit 1 ccm *M*/40 Histidin, daher 19,39 mg Histidin auf 100 ccm Harn, zugesetzt und die Beseitigung der chromogenen Harnsubstanzen u.s.w. wurden in oben erwähnter Weise ausgeführt.

TABELLE I.

Person	Histidin	Histidin für 100 ccm umgerechnet		
	Harn allein	Harn + Histidin	wiedergefundenes Histidin	
A	17,28 mg	36,36 mg	19,08 mg	98,4%
B	12,98 "	32,30 "	19,32 "	99,5 "
C	15,91 "	35,29 "	19,38 "	100,0 "
D	spur	19,42 "	19,42 "	100,1 "
E	19,52 "	39,90 "	19,03 "	100,0 "
F	6,82 "	25,85 "	19,03 "	98,2 "
G	8,86 "	28,08 "	19,22 "	99,2 "

2. Photometrische Histidinbestimmung.

Die Kolorimetrie mit Dubosqueschem Apparat ist wohl für den praktischen Zweck schon an sich hinreichend. Der fermentative Histidinabbau kann nach Kurihara (1939) durch Histidinbestimmung im Trichloressigsäurefiltrat gemessen werden. Die Ausscheidung des Histidins im Harn kann nun durch vorliegendes neues Verfahren genau bestimmt werden. Es mag jedoch vorkommen, dass die genaue Bestimmung einer sehr geringen Histidinmenge gewünscht wird. Verfasser hat daher noch eine photometrische Bestimmung ausgeführt. Der Apparat war das Pulfrich-Photometer. Die Extinktionskurve der alkalischen blauen Lösung.

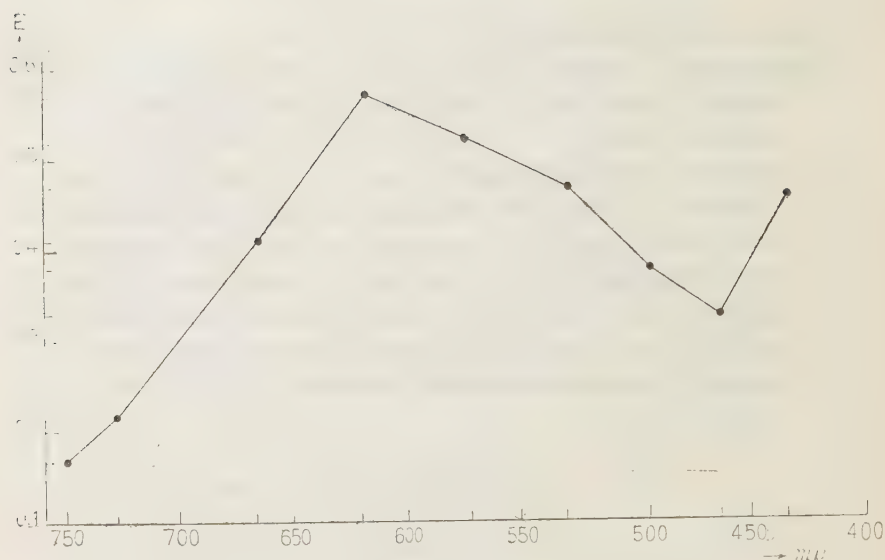


Fig. 1.

Extinktionskurve des $M/1000$ Histidins.

Schichtdicke der Kuvette 10 mm.

die von 5 cem bromierter $M/1000$ Histidin-Phosphorsäurelösung wie in oben erwähnter Weise hergestellt wurde, wird in Fig. 1 angegeben. Die maximale Extinktion findet sich in der Nähe der $600m\mu$ Wellenlänge. Für die Photometrie ist nach der Erfahrung des Verfassers der Filter S 57 vorteilhafter als S 61. Unter Verwendung des S 57 wurde das Extinktion-Konzentration-Verhältnis (Tabelle II und Fig. 2) gemessen. $M/200$ Histidinlösung in $M/10$ Phosphorsäure

TABELLE II.

Histidin	E	Histidin	E
77,54 mg/dl	2,558	7,75 mg/dl	0,258
38,77 "	1,280	5,17 "	0,172
25,85 "	0,858	3,88 "	0,129
19,39 "	0,645	2,58 "	0,086
15,51 "	0,516	1,94 "	0,065
11,08 "	0,371		

wurde auf verschiedene Weise mit $M/10$ Phosphorsäure verdünnt. Jede Lösung wurde direkt bromiert und 5 ccm Filtrat zur weiteren Farbenreaktion gebraucht. Innerhalb des Konzentrationsbereiches $M/8000$ (1,94 mg/dl) bis $M/200$ (77,54 mg/dl) waren die erhaltenen Extinktionen den Histidinemengen praktisch genau proportional. Man kann also aus dem bemessenen Extinktionskoeffizienten den Histidingehalt in folgender Weise berechnen. $30,0 \times \text{Extinktionskoeffizient} = \text{mg/dl Histidingehalt}$. Um zu prüfen, ob die Beseitigung der Harnfarbstoffe nach dem Verfahren des Verfassers ohne Histidinverlust ausführbar ist, wurde der Histidingehalt

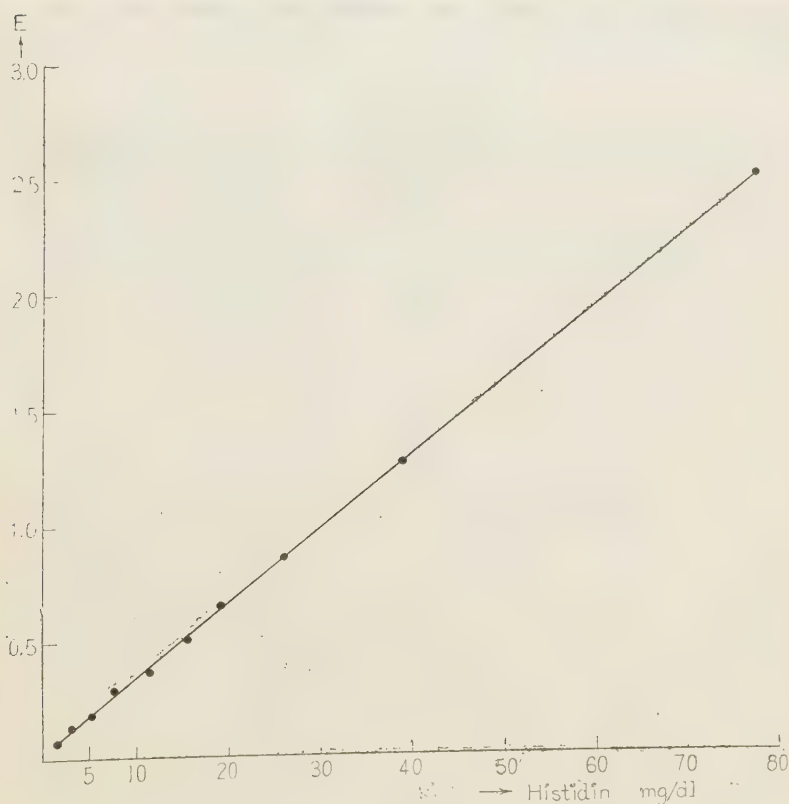


Fig. 2.

Extinktionskoeffizient-Konzentration-Kurve des Histidins.

Filter S 57, Schichtdicke der Kuvette 10 mm.

normalen Männerharns nochmals und zwar 1) ohne Histidinzusatz und 2) nach Zusatz verschiedener, aber bekannter Histidinnengen photometrisch gemessen. Da 5 ccm einer bromierten Harnhistidinlösung wie oben erwähnt 4 ccm Harn entsprechen, errechnet man das Harnhistidin in folgender Weise: $30,0 \times \text{Extinktionskoeffizient} \times 5/4 = \text{mg/dl Harnhistidin}$. Bei dem Zusatzversuch wurden 20 ccm Harn vor der Beseitigung der Harnfarbstoffe mit 1 ccm M/20–M/100 Histidinlösung gemischt. In Tabelle III wird der Histidin-gehalt für 20 ccm Harn umgerechnet, um die vorher zugesetzte Histidinmenge und die wiedergefundene Menge klar ersichtlich nebeneinander anzugeben. Die Bestimmung verlief ganz quantitativ.

TABELLE III.

Histidin Person	in 20 ccm Harn	in 20 ccm mit Histidin zugesetztem Harn	vorher zugesetztes Histidin	wieder- gefundenes Histidin
1	1,75 mg (8,77 mg/dl)	5,63 mg	3,88 mg (1 ccm M/40)	3,88 mg
2	3,05 " (15,25 ")	4,99 "	1,94 " (1 ccm M/80)	1,94 "
3	2,73 " (13,67 ")	5,84 "	3,11 " (1 ccm M/50)	3,11 "
4	2,73 " (13,67 ")	4,81 "	1,55 " (1 ccm M/100)	1,58 "
5	2,49 " (12,46 ")	10,25 "	7,76 " (1 ccm M/20)	7,76 "
6	1,54 " (7,72 ")	2,33 "	0,78 " (1 ccm M/200)	0,79 "
7	3,65 " (18,27 ")	6,78 "	3,11 " (1 ccm M/50)	3,13 "
8	5,52 " (27,58 ")	9,37 "	3,88 " (1 ccm M/40)	3,85 "
9	5,52 " (27,58 ")	7,08 "	1,55 " (1 ccm M/100)	1,56 "
10	2,33 " (11,63 ")	4,24 "	1,94 " (1 ccm M/80)	1,91 "

ZUSAMMENFASSUNG.

Die kolorimetrische Histidin-Bestimmung von Kurihara (1939) wurde verbessert. Die hauptsächlichsten Veränderungen waren folgende:

1) Beseitigung der Harnfarbstoffe durch Sublimat sowie die des Kalziums als Oxalat wurden in saurer Reaktion ausgeführt.

2) Flockige Ausscheidung des Histidin-Quecksilbersalzes in alkalischer Reaktion konnte durch Bikarbonat-Karbonatgemisch statt Boraxlösung stark beschleunigt werden.

3) Bromierung des Histidins in $M/10$ Phosphorsäure statt in verdünnter Trichloressigsäure verursachte starke Vertiefung der endlichen blauen Verfärbung der bromierten Histidinlösung in alkalischer Reaktion.

Nach diesem Verfahren konnte das Harnhistidin kolorimetrisch sowie photometrisch genau bestimmt werden.

Diese Untersuchungen wurden unter Leitung von Prof. Akamatsu mit der finanziellen Unterstützung ausgeführt, die dem Herrn Professor Akamatsu vom japanischen Unterrichtsministerium für wissenschaftliche Forschung zur Verfügung gestellt wurde.

LITERATUR.

- Hunter, G. (1922): Biochem. J., **16**, 638.
Kapeller-Adler, R. (1933): Biochem. Z., **264**, 131.
Knoop, F. (1908): Beitr. chem. Physiol. u. Path., **11**, 356.
Kurihara, Z. (1939): J. Biochem., **30**, 205.
Langley, W. (1941): J. biol. chem., **137**, 255.
Niendorf, F. (1939): Z. physiol. Chem., **259**, 194.
Racker, E. (1941): Biochem. J., **35**, 667.
Sakaguchi, R. (1940): J. Biochem., **31**, 289.
Sera, K. (1939): Osaka Igk. Z. (japanisch), **38**, 1038.

ÜBER DEN BILDUNGSMECHANISMUS DER CHENODESOXYCHOLSÄURE IM ORGANISMUS.

IV. Über das Schicksal der 3-Oxy- Δ^7 -Cholensäure im Kaninchen- und Meerschweinchenorganismus.

VON

YOSIMI KATAOKA.

(Aus dem Biochemischen Institut zu Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 14. März 1942.)

In den vorigen Mitteilungen habe ich berichtet, dass im Leberschnitt von Meerschweinchen u. Kröten (Y. Kataoka 1941) und Meerschwein u. Huhn (Y. Kataoka 1941) die Chenodesoxycholsäure über 3-Oxy-7-ketocholansäure in Dehydrochenodesoxycholsäure oxydiert, aber die Dehydrochenodesoxycholsäure in ihnen über 3-Oxy-7-ketocholansäure in Chenodesoxycholsäure reduziert wird und dass im Krötenorganismus (Y. Kataoka 1941) die verabreichte Chenodesoxycholsäure in 3-Oxy-7-ketocholansäure oxydiert und in Harn und Galle ausgeschieden wird. Diese Tatsache zeigt, dass bei der Bildung der Chenodesoxycholsäure aus Cholsäure im Organismus erst die Reduktodehydrocholsäure, dann 3-Oxy-7-ketocholansäure und endlich die Dehydrochenodesoxycholsäure gebildet wird, um diese Diketosäure weiter über 3-Oxy-7-ketocholansäure in Chenodesoxycholsäure verwandeln zu können.

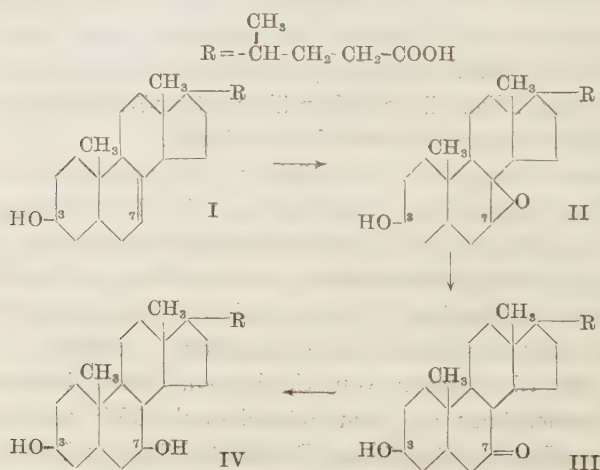
Einerseits um dies zu bestätigen und andererseits um die Bildung der sekundären Alkoholgruppe im B-Ring des Sterinmoleküls zu beobachten, wenn die Gallensäure aus Sterinen gebildet wird, wurde hier ein Modellversuch vorgenommen und das Schicksal der 3-Oxy- Δ^7 -cholensäure (Yamasaki u. Takahashi 1938) im Kaninchen- und Meerschweinchenorganismus verfolgt.

Aus 9,2 Liter Harn von Kaninchen, denen insgesamt 6 g 3-Oxy- Δ^7 -cholensäure (I) vom Schmelzpunkt 185° subkutan verabreicht wurden, wurden 60 mg Desoxycholsäure und einige Milli-

gram Chenodesoxycholsäure (IV) isoliert und beide als Diformylester identifiziert. Die verabreichte 3-Oxy- Δ^7 -cholsäure wurde nach Yamasaki u. Takahashi (1938) durch Einwirkung der Salzsäure auf Chenodesoxycholsäure erhalten. Diese Tatsache zeigt, dass die im Harn von Kaninchen ausgeschiedene Chenodesoxycholsäure (IV) durch Oxydation der Doppelbindung an C₇-C₈ der Cholsäure über 3-Oxy-7-ketocholsäure (II u. III) aus der 3-Oxy- Δ^7 -cholsäure (I) gebildet worden ist, was wiederum zeigt, dass die HO-Gruppe des Gallensäuremoleküls aus der Doppelbindung im Sterinmolekül wie z. B. aus denen des Ergosterins u. 7-Dehydrocholesterins gebildet werden dürfte.

Daher stammt die hier aus dem Harn erhaltene Chenodesoxycholsäure (IV) höchstwahrscheinlich von der verabreichten 3-Oxy- Δ^7 -cholsäure (I). Die mit der Chenodesoxycholsäure im Harn ausgeschiedene Desoxycholsäure stammt aber sicher nicht von der 3-Oxy- Δ^7 -cholsäure sondern von der eigentlichen Desoxycholsäure im Kaninchenorganismus, die in der Galle von Kaninchen gepaart vorkommt, wie Tukamoto (1939) bei Zufuhr von 3-Oxy-6-ketocholsäure freie Desoxycholsäure im Kaninchenbarn nachgewiesen hat.

Aus 21,61 Liter Harn von Meerschweinchen, denen 3-Oxy- Δ^7 -cholsäure verabreicht wurde, wurde 0,3 g Chenodesoxycholsäure



erhalten, was ebenfalls zeigt, dass diese Säure wohl von der verabreichten 3-Oxy- Δ^7 -cholensäure stammt, obwohl die Chenodesoxycholsäure eigentlich in der Meerschweinchengalle enthalten ist.

EXPERIMENTELLER TEIL.

1. *Beim Kaninchen.*

Die nach der Vorschrift von Yamasaki u. Takahashi (1938) aus Chenodesoxycholsäure dargestellte 3-Oxy- Δ^7 -cholensäure vom Schmelzpunkt 185° wurde in einer äquivalenten Menge $N/10$ Natronlauge gelöst und als 1%ige Natriumsalzlösung zum Versuch verwendet. 2–3 ccm dieser Lösung wurden in die Ohrvenen von gesunden Kaninchen täglich einmal verabreicht, die mit einer bestimmten Menge Okara aus Sojabohnen gefüttert worden waren. Die gesamte Menge der injizierten 3-Oxy- Δ^7 -cholensäure betrug 5 g. Der angesammelte Harn belief sich auf 9,2 Liter. Dieser wurde mit dem elektrischen Föhn vollständig getrocknet und mit siedendem absolutem Alkohol erschöpfend extrahiert.

Von diesem Extrakt wurde unter Zusatz von 300 ccm einer 5%igen Natriumcarbonatlösung der Alkohol abgedampft, die Lösung unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Petroläther geschüttelt, um das Fett zu entfernen, die Fällung wieder in einer 10%igen Kalilauge gelöst und der zurückgebliebene Petroläther abgedampft. Diese Lösung wurde wieder unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und filtriert.

Die Fällung wurde getrocknet und in Äther digeriert und das Filtrat mit Äther geschüttelt. Die beiden Ätherfraktionen wurden abgedampft, mit Petroläther digeriert und ganz getrocknet. Diese trockne Masse wurde in absolutem Äther digeriert. Die Behandlung mit Petroläther u. Äther wurde über zehnmal wiederholt. Der Rückstand wurde in 2%iger Ammoniaklösung gelöst, mit einer 5%igen Chlorbariumlösung ausgefällt und filtriert.

Die Bariumsalzfällung wurde in Sodalösung eine Stunde lang auf dem Wasserbade gekocht und die Lösung unter Abkühlung und Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mittelst Äthers geschüttelt. Der Ätherauszug wurde verdunsten gelassen, wobei ca. 60 mg

Krystalle vom Schmelzpunkt 170–180° abgeschieden wurden.

Aus dieser ätherischen Mutterlauge wurde beim Abdampfen eine pulverige Masse erhalten, die bei Liebermannscher Reaktion eine violette Farbe zeigt. Die aus Essigäther umkrystallisierte Substanz schmilzt bei 110–130°. Die Substanz wurde mit 10 cem einer 80%igen Ameisensäurelösung auf dem Wasserbade 5 Stunden lang gekocht. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum getrocknet und der Rückstand aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Prächtige Nadeln vom Schmelzpunkt 182°.

Der Krystall zeigt mit reiner Diformylchenodesoxycholsäure (Wieland u. Gustav 1924; Sihm 1938) keine Schmelzpunktdepression.

3,680 mg Subst.: 9,380 mg CO₂, 2,850 mg H₂O.

C ₂₆ H ₄₀ O ₆	Ber.	C 69,59%	H 8,99%
	Gef.	" 69,52 "	" 8,66 "

Die beim Verdunsten des Äthers ausscheidenden Krystalle wurden aus Eisessig umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzpunkt 140°. Diese Krystalle wurden in üblicher Weise in Diformylester verwandelt. Prismen vom Schmelzpunkt 193°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Diformyldeoxycholsäure (Wieland u. Boersch 1920).

3,355 mg Subst.: 8,580 mg CO₂, 2,695 mg H₂O.

C ₂₆ H ₄₀ O ₆	Ber.	C 69,59%	H 8,99%
	Gef.	" 69,75 "	" 8,99 "

2. Beim Meerschweinchen.

Den 65 gesunden Meerschweinchen wurden 23 g 3-Oxy-Δ⁷-cholensäure als 1%ige Natriumsalzlösung in die Bauchhöhle eingespritzt, ihr Harn durch Katheterisierung gesammelt und die Gallenblasen nach Töten des Tieres herausgenommen, um die Galle zu sammeln.

Der Harn.

21,61 Liter angesammelter Harn wurden mittelst des elektrischen Föhns zum Trocknen verdampft und mit absolutem Alkohol abermals erschöpfend extrahiert. Vom Alkoholextrakt

wurde der Alkohol abgedampft und mit einer 5%igen Natronlauge-
lösung 2 Stunden lang hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde unter
Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Äther ausgeschüttelt.
Der Ätherauszug wurde nach dem Verdampfen in Petroläther
digeriert, um ihn von Fett und Farbstoff zu befreien. Diese Be-
handlung wurde über zehnmal wiederholt. Die Substanz wurde
in 2%iger Ammoniaklösung gelöst und mit einer 5%igen Barium-
chloridlösung ausgefällt.

Die Fällung wurde mit einer 5%igen Natriumcarbonatlösung
umgekocht und die Lösung unter Ansäuerung mit verdünnter
Salzsäure mit Äther ausgeschüttelt. Aus dem Ätherauszug wurde
wie vorher eine amorphe schwer krystallisierbare Masse erhalten,
die bei Liebermannscher Reaktion eine violette Farbe zeigt und nach
Umkristallisieren aus Essigäther bei 110–135° schmilzt. Ausbeute
3 g.

Diese Substanz wurde in üblicher Weise durch Kochen mit
80%iger Ameisensäurelösung verestert. Nadeln vom Schmelzpunkt
181°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Diformylcheno-
desoxycholsäure (Wieland u. Gustav 1924, Sihm 1938).

4,050 mg Subst.: 10,350 mg CO₂, 3,235 mg H₂O.

C ₂₆ H ₄₀ O ₆	Ber.	C 69,59%	H 8,99%
	Gef.	" 69,70 "	" 8,94 "

Die Galle.

In der Galle von 65 Meerschweinchen wurden nur eigentliche
Chenodesoxycholsäure und 3-Oxy-7-ketocholansäure, aber nicht
andere Gallensäuren vorgefunden.

LITERATUR.

- Kataoka, Y. (1941): *Jl. of Bioch.*, **34**, 87, 93 u. 99.
Sihm, T. S. (1938): *Jl. of Bioch.*, **28**, 165.
Tukamoto, M. (1939): *Z. Physiol. Chem.*, **260**, 210.
Wieland, H. u. Boersch, E. (1920): *Z. Physiol. Chem.*, **110**, 151.
Wieland, H. u. Gustav, R. (1924): *Z. Physiol. Chem.*, **140**, 198.
Yamasaki, K. u. Takahashi, K. (1938): *Z. Physiol. Chem.*, **256**, 21.

ÜBER DEN BILDUNGSMECHANISMUS DER CHENODESOXYCHOLSÄURE IM ORGANISMUS.

V. Über das Schicksal der 3,7-Dioxy-12-ketocholansäure im Kaninchenorganismus.

VON

YOSIMI KATAOKA.

(Aus dem Biochemischen Institut zu Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 14. März 1942.)

In den vorigen Mitteilungen (1941) wurde bereits erwähnt, dass die Chenodesoxycholsäure höchstwahrscheinlich erst über Reduktodehydrocholsäure (Okasaki 1941), dann über 3-Oxy-7-ketocholansäure (Imai 1937) aus Cholsäure gebildet werden dürfte und zwar dass die 3-Oxy-7-ketocholansäure erst in Dehydrochenodesoxycholsäure oxydiert, dann wieder in 3-Oxy-7-ketocholansäure reduziert wird, um weiter in Chenodesoxycholsäure verwandelt werden zu können, genau wie Reduktodehydrocholsäure erst nach der Bildung von Dehydrocholsäure aus Cholsäure gebildet werden konnte, was von Sasaki (1940) bewiesen wurde.

Um dies weiter zu bestätigen, habe ich den Kaninchen 27 g 3,7-Dioxy-12-ketocholansäure verabreicht und aus 10,32 Liter Harn ca. 0,3 g Chenodesoxycholsäure gefunden, was zeigt, dass die Bildung der Chenodesoxycholsäure aus Cholsäure entweder über 3,7-Dioxy-12-ketocholansäure oder erst über Dehydrocholsäure, dann weiter über Reduktodehydrocholsäure und über 3-Oxy-7-ketocholansäure vor sich gehen dürfte.

Es ist eine Tatsache, dass die Chenodesoxycholsäure im Kaninchenorganismus aus 3-Oxy-17-cholensäure sowie aus 3,7-Dioxy-12-ketocholansäure gebildet wird, was wohl zeigt, dass die Chenodesoxycholsäure im Organismus von Cholsäure abgeleitet werden kann.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

3,7-Dioxy-12-ketocholansäure wurde nach der Vorschrift von Wieland u. Kapithel (1932) bereitet. Diese Säuren wurden den 13 gesunden Kaninchen in die Ohrvenen als 2%ige Natriumsalzlösung injiziert, ihr Harn durch Katheterisierung gesammelt und ihre Gallenblasen nach der Injektion nach Abtöten durch Verblutung herausgenommen. Der angesammelte Harn betrug insgesamt 10,32 Liter und die Galle ca. 70 ccm. Die verabreichte 3,7-Dioxy-12-ketocholansäure betrug insgesamt 27 g.

Der Harn.

Der angesammelte Harn wurde mit dem elektrischen Föhn vollständig getrocknet und mit absolutem Alkohol erschöpfend einige Male extrahiert. Der Alkoholextrakt wurde durch Abdampfen vom Alkohol befreit, die Lösung von ca. 300 ccm mit Kalilauge versetzt, bis die Lösung 5% davon enthielt, und 3 Stunden lang erhitzt. Das Hydrolysat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die dabei abgeschiedene schwarzbraune Fällung wurde nach dem Trocknen erst in Petroläther, dann in Äther einige Male digeriert, um sie vom Fett zu befreien.

Diese Behandlung wurde noch mehr als zehnmal wiederholt. Die Substanz wurde in 2%iger Ammoniaklösung gelöst, mit einer 5%igen Bariumchloridlösung versetzt und die dabei abgeschiedene Fällung abfiltriert. Die Fällung wurde in Natriumcarbonatlösung umgekocht und die Lösung unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Äther geschüttelt.

Aus dem Ätherauszug wurden beim Verdunsten des Äthers einige Krystalle erhalten, die die Desoxycholsäurefraktion ausmachen müssen. Aus dieser Mutterlauge wurde beim Verdampfen des Äthers noch eine Substanz erhalten, die bei Liebermannscher Reaktion eine violette Farbe zeigt und nach Umkrystallisieren aus Essigäther bei 112–130° schmilzt.

Die Substanz wurde in üblicher Weise durch Kochen in Ameisensäure in Diformylester verwandelt, der bei 183° schmilzt. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Diformylchenodesoxycholsäure. Ausbeute 50 mg.

4,120 mg Subst.: 10,560 mg CO₂, 3,250 mg H₂O.

C ₂₆ H ₄₀ O ₆	Ber. C 69,59%	H 8,99%
	Gef. " 69,90 "	" 8,83 "

Die Desoxycholsäurefraktion wurde in üblicher Weise in Ameisensäurelösung gekocht und der beim Einengen der Lösung erstarrte Diformylester (Wieland u. Boersch 1920) aus Alkohol umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 193°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Diformyl-desoxycholsäure. Ausbeute 100 mg.

4,375 mg Subst.: 11,170 mg CO₂, 3,515 mg H₂O.

C ₂₆ H ₄₀ O ₆	Ber. C 69,59%	H 8,99%
	Gef. " 69,63 "	" 8,99 "

Die Galle.

In 70 ccm Galle wurde ausser eigentlicher Gallensäure keine andere Gallensäure vorgefunden.

LITERATUR.

- Imai, I. (1937): Z. Physiol. Chem., **248**, 65.
 Kataoka, Y. (1941): Jl. of Bioch., **34**, 87–93–99.
 Okasaki, Y. (1941): Jl. of Bioch., **33**, 83.
 Sasaki, T. (1940): Jl. of Bioch., **32**, 81.
 Wieland, H. u. Kapithel, W. (1932): Z. Physiol. Chem., **212**, 269.
 Wieland, H. u. Boersch, E. (1920): Z. Physiol. Chem., **110**, 151.

ÜBER DIE GALLENSÄUREN VON WASSER-SALAMANDERN.

I. Über die Gallensäure und Steroide in der Galle des Wassersalamanders (*Diemyctylus Pyrrhogaster*).

VON

YASUYA OKASAKI.

(Aus dem Biochemischen Institut zu Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 22. April 1942.)

Durch eine Reihe von Untersuchungen über die Gallensäuren von verschiedenen Tieren und über das Schicksal der verschiedenen Gallensäuren im Tierorganismus im hiesigen Institut wurde wahrscheinlich gemacht, dass die Gallensäure von 24 Kohlenstoffatomen in der Galle, wie z. B. Cholsäure, ein Stoffwechselprodukt des als Nahrungsbestandteil aufgenommen Sterins bzw. des Ergosterins oder des Dehydrocholesterins ist. Somit wurden verschiedene als intermediäres Stoffwechselprodukt zu betrachtende kohlenstoffreichere Gallensäuren von 26–27–28 Kohlenstoffatomen und ein solches Steroid von 27–28 Kohlenstoffatomen in der Galle gefunden, die durch Zufuhr im Organismus in gewöhnliche Gallensäure von 24 Kohlenstoffatomen verwandelt werden konnten.

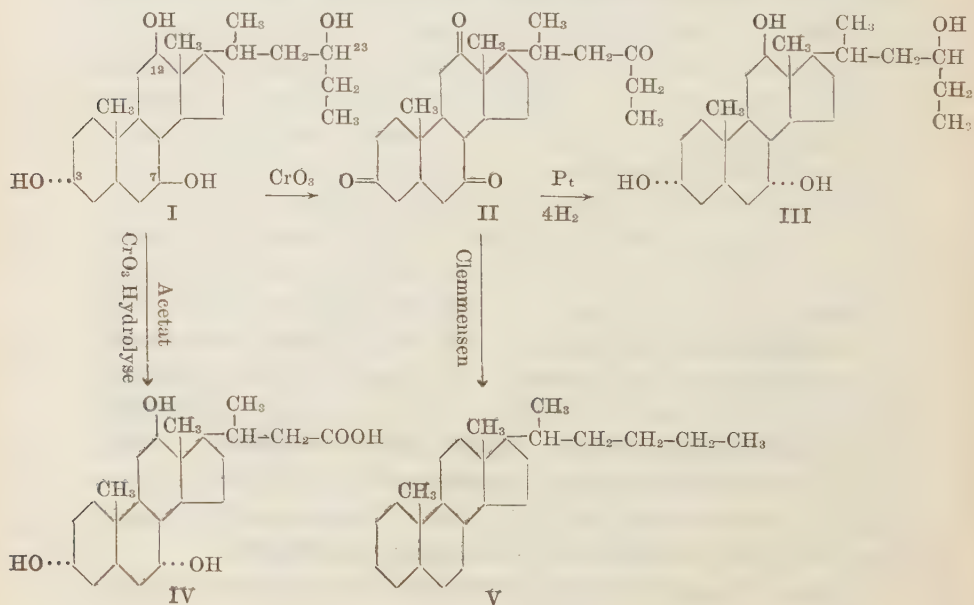
Zum Beispiel wurde einige Steroide wie Tetraoxy-norbufostan $C_{27}H_{48}O_1$ (Makino 1933) α -Scymnol $C_{27}H_{46}O_5$ aus Haifischgalle (Hammarsten 1909) und aus Akaeifischgalle (Asikari 1939) u. Pentaoxy-bufostan $C_{28}H_{50}O_5$ (Kazuno 1940) und einige kohlenstoffreichere Gallensäuren wie Trioxy-bufo-sterocholensäure $C_{28}H_{46}O_5$ (Shimizu u. Oda 1934; Shimizu u. Kazuno 1936/37) aus der Krötengalle gefunden. Weiter wurde von Mabuti (1941) α - u. β -Trioxy-bisnor-sterocholensäure $C_{26}H_{44}O_5$ aus der Galle von *Rana Catesbina* und von Ohta (1939) Tetraoxy-nor-sterocholensäure $C_{27}H_{46}O_6$ aus der „Gigi“-Fischgalle vorgefunden.

Dieses Pentaoxy-bufostan sowie die Trioxy-bufo-sterocholen-

säure sollen nach Iwaki (1942) im Meerschweinchenorganismus erst in Cholsäure, dann in Desoxycholsäure übergeführt und im Harn ausgeschieden werden.

Um den Bildungsmechanismus der Gallensäure von 24 Kohlenstoffatomen aus den Sterinen zu erklären, ist es zweckmässig ein intermediäres Produkt des Sterins zu Gallensäure aus der Galle von verschiedenen Tieren zu gewinnen und seine chemische Konstitution festzustellen.

In diesem Sinne habe ich die Galle von Wassersalamandern untersucht und aus 1,5 Liter Galle (100200 Tieren) 0,27 g Cholsäure, 0,2 g Desoxycholsäure und ca. 11,5 g ein der Formel $C_{25}H_{44}O_4$ entsprechendes Steroid, Tetraoxy-isohomocholan vom Schmelzpunkt 241° und von einer spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{15} = +26,28^\circ$ gewonnen, welch letzteres in der Galle als Schwefelsäureester vorkommt und den Hauptbestandteil der Galle ausmacht. Daneben wurden noch zwei Steroide vom Schmelzpunkt 248° u. 252° in einer Ausbeute von je 40 mg u. 30 mg gewonnen. Diese Substanz vom Schmelzpunkt 241° zeigt anfangs keine Hammarstensehe Reaktion,



wohl aber nach mehrmaliger Umkrystallisation, was zeigt, dass die Substanz vom Schmelzpunkt 241° nicht einheitlich ist und zwar dass ein isomeres Steroid beigemischt zu sein scheint. Es scheint ein Mischkrystall der beiden α - und β -Tetraoxy-isohomocholane zu sein.

Durch Oxydation mit Chromsäure wird das Tetraoxy-isohomocholan (I) $C_{25}H_{44}O_4$ in Tetraketo-isohomocholan (II) vom Schmelzpunkt 173° verwandelt, welches Tetraoxim ergibt und eine positive Jaffesche Reaktion zeigt, was alles zeigt, dass das neue Steroid vier sekundäre Alkoholgruppen hat und dass sich die eine in der Stellung an C_3 des Moleküls befindet.

Dieses Tetraketo-isohomocholan (II) ist durch Alkali unverändert geblieben und wurde durch katalytische Hydrierung mit Platinoxid und Wasserstoff reduziert, wobei unter Aufnahme von vier Molen Wasserstoff ein von dem ursprünglichen Tetraoxy-isohomocholan ganz verschiedenes Steroid vom Schmelzpunkt 231° gebildet wird, welches ich als α -Tetraoxy-isohomocholan (III) bezeichnen möchte, da das letztere eine positive Hammarstensche Reaktion ergibt, was also zeigt, dass die drei sekundären Alkoholgruppen sich in den Stellungen an C_3 , C_7 und C_{12} befinden dürften, genau wie es bei der Cholsäure der Fall war. Dagegen möchte ich einen anderen Bestandteil des ursprünglichen Steroides als β -Tetraoxy-isohomocholan bezeichnen. Der Unterschied zwischen beiden Steroiden, α -Tetraoxy-isohomocholan (III) und β -Tetraoxy-isohomocholan dürfte auf der sterischen Verschiedenheit der einen sekundären Alkoholgruppe in der Stellung an C_7 (oder C_{12}) beruhen. Da das ursprüngliche Tetraoxy-isohomocholan (I) in Alkohol durch Digitonin nicht fällbar ist, so dürfte sich die sekundäre Alkoholgruppe in der Stellung an C_3 des Tetraoxy-isohomocholans in gleicher sterischer Lage befinden, wie es bei Cholsäure der Fall ist.

Durch Clemmensen'sche Reduktion wurde das Tetraketo-isohomocholan (II) in Kohlenwasserstoff, Isohomocholan von der Formel $C_{25}H_{44}$ (V) vom Schmelzpunkt 51° verwandelt. Dieses ist aber von dem durch Synthese aus Cholansäure gewonnenen Homocholan $C_{25}H_{44}$ vom Schmelzpunkt 75° (Okasaki 1942) ganz

verschieden und bei der Mischprobe schmelzen die beiden bei 37–40°.

Der Unterschied zwischen beiden Steroiden beruht höchstwahrscheinlich auf der Verschiedenheit der sterischen Konfiguration der Verknüpfung von beiden Ringen B u. C beider Steroidmoleküle. Da das Isohomocholan (V) aus Tetraoxy-isohomocholan (I) nicht ein gleiches Grundskelett wie bei der Cholsäure hat und von einem synthetisierten Homocholan verschieden ist, möchte ich das erstere als Isohomocholan (V) bezeichnen.

Das Tetraoxy-isohomocholan blieb durch Einwirkung von Permanganat sowie von Bleitetraacetat unverändert. Bei der energischen Oxydation von Tetraoxy-isohomocholan-acetat mit Chromsäure, dann durch Hydrolyse wurde eine Säure (IV) (Rohe Säure schmilzt bei 210–211°) erhalten, die nach Analyse der Formel $C_{23}H_{38}O_5$ entspricht. Die Säure (IV) zeigt wohl eine positive Hammarstensche, aber keine Myliussehe Reaktion und eine Schmelzpunktdepression mit Norcholsäure ($C_{23}H_{38}O_5$) (Shimizu u. Kazuno 1936) vom Schmelzpunkt 187°. Der Methyl ester der Säure schmilzt bei 218–220° und bei der Mischprobe mit Norcholsäure-methylester vom Schmelzpunkt 155° zeigt er deutliche Schmelzpunktdepression. Diese Säure möchte ich als α -Isonorcholsäure (IV) bezeichnen, da der Unterschied zwischen dieser Säure (IV) und der Norcholsäure (Shimizu u. Kazuno 1936) höchstwahrscheinlich auf der Verschiedenheit der Ringverknüpfung (vielleicht B u. C) beruhen dürfte.

Diese Tatsache zeigt, dass sich die andere sekundäre Alkoholgruppe des Tetraoxy-isohomocholans in der Stellung an C_{23} befinden muss. Tetraoxy-isohomocholan dürfte also 3.7.12.23-Tetraoxy-isohomocholan (I) sein.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Unter 100200 Wassersalamandern, die als Versuchsmaterial verwendet wurden, wurden 15000 Tiere aus der Provinz Okayama, 25000 aus der Provinz Kagawa, 8200 aus der Provinz Yamagata und 52000 aus der Provinz Hyogo gesammelt.

Die Gallenblase der Wassersalamander ist reiskorngross und

enthält eine gegen Lackmus alkalisch reagierende blaugrüne Galle. Von der durch Alkohol von Mucin und mittelst Petroläther von fettigen Substanzen befreite Gallenflüssigkeit (1.5 Liter Galle) wurden die Lösungsmitteln abgedampft und zu einem Volumen von 1 Liter eingengt.

Diese Lösung wurde mit Kochsalz versetzt, bis die Lösung 10% davon enthalten konnte und auf diese Weise zweimal ausgesalzen. Die dabei abgeschiedene weisse Fällung wurde abfiltriert. Die Fällung wurde als Neutral- und das Filtrat als Säurefraktion bearbeitet.

I. Säurefraktion.

Das von der ausgesalzenen Fällung getrennte Filtrat wurde mit 200 ccm Alkohol und 100 g Kalilauge versetzt, soweit die Lösung 10% davon enthalten konnte, und auf dem Sandbad 100 Stunden hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit Wasser dreifach verdünnt, auf dem Wasserbade der Alkohol abgedampft und von der dabei abgeschiedenen gelatinösen Masse (neutrale Substanz) abfiltriert.

1) Cholsäure.

Das bräunliche Filtrat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit einer grösseren Menge von Äther ausgeschüttelt und die Ätherlösung nach dem Waschen mit Wasser im Zimmer verdunsten gelassen. Dabei schieden sich gelblich gefärbte Krystalle ab, die abfiltriert wurden. Die Krystalle wurden aus Alkohol-Wasser mehrmals umkrystallisiert. Oktaeder vom Schmelzpunkt 198°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Cholsäure. Das von Cholsäurekrystallen abgetrennte Filtrat wurde bis zum Trocknen eingengt, der Rückstand in 2%iger Ammoniaklösung gelöst und mit einer 5%igen Bariumchloridlösung versetzt. Die dabei abgeschiedene Fällung wurde nach einer Nacht abfiltriert, das Filtrat mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und die Fällung nach dem Trocknen in Essigäther aufgenommen. Aus dem Essigätherauszug wurden beim Verdunsten 0,12 g Nadelkrystalle erhalten. Die aus Alkohol umkrystallisierte Substanz krystallisiert in Oktaedern vom Schmelzpunkt 198°. Der Krystall zeigt eine posi-

tive Hammarstense und Myliusse Reaktion und keine Schmelzpunktdepression mit reiner Cholsäure. Die gesamte Ausbeute beträgt 0,27 g.

3,280 mg Subst.: 8,485 mg CO_2 , 2,870 mg H_2O .

$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_5$

Ber. C 70,53% H 9,87%

Gef. " 70,59 " " 9,79 "

2) Desoxycholsäure.

Die abfiltrierte Bariumsalzfällung wurde in 5%iger Sodalösung auf dem Wasserbade 2 Stunden lang umgekocht und abfiltriert. Das Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert, mit Äther geschüttelt und die Ätherlösung nach dem Waschen mit Wasser im Zimmer verdunsten gelassen. Die dabei abgeschiedenen Kristalle wurden aus Eisessig umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzpunkt 145° . Ausbeute 20 mg. Keine Schmelzpunktdepression mit Essig-Choleinsäure.

3,125 mg Subst.: 7,910 mg CO_2 , 2,775 mg H_2O .

$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4 \cdot \text{CH}_3\text{COOH}$

Ber. C 68,97% H 9,84%

Gef. " 69,03 " " 9,86 "

II. Neutrale Fraktion.

Die aus Galle durch Aussalzung mit Kochsalz erhaltene Fällung von ca. 60 g wurde in 500 ccm warmem Wasser gelöst, mit 500 ccm Alkohol und mit 100 g Kalilauge versetzt und auf dem Sandbad 120 Stunden hydrolysiert. Das Hydrolysats wurde mit Wasser dreifach verdünnt, auf dem Wasserbade der Alkohol abgedampft und von dem dabei abgeschiedenen Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde zum weiteren Versuch auf Schwefelsäureionen verwendet.

Der Niederschlag wurde in Essigäther erwärmend gelöst, mit warmem Wasser gut gewaschen, zum Trocknen abgedampft und der Rückstand nach dem Trocknen pulverisiert. Das orangegelbe Pulver ist in Methanol, Äthanol, Chloroform, Eisessig leicht, aber in Aceton, Benzol und Essigäther schwer und in Äther sehr schwer löslich. Es schmilzt bei $215-234^\circ$. Bei Liebermannscher Reaktion zeigt es eine braunrote Farbe mit starker Fluoreszenz.

1) Tetraoxy-isohomocholan $\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{O}_4$ (I).

Das orangegelbe getrocknete Pulver wurde im Soxhletapparat mit Äther 48 Stunden extrahiert. Aus dem Ätherauszug wurden feine Nadelkrystalle erhalten. Diese Krystalle wurden abfiltriert und das ätherische Filtrat abdunsten gelassen. Der Rückstand wurde in Aceton-Benzol (1:1) im Verhältniß von 0,2% gelöst und durch eine Säule von Aluminiumoxyd nach Brockmann einlaufen gelassen, wobei ein farbloses klares Filtrat erhalten wurde. Dieses Filtrat wurde zum Trocknen abgedampft und der Rückstand pulverisiert. Das Pulver wurde aus Essigäther umkrystallisiert. Tafeln vom Schmelzpunkt 240–241°. Ausbeute 11,5 g. Der Krystall zeigt keine Hammarstensehe Reaktion.

Bei Liebermannscher Reaktion zeigt der Krystall eine anfangs orangerote, dann braunrote Farbe mit starker Fluoreszenz. Die Substanz wird durch alkoholische Digitoninlösung nicht gefällt.

spec. Drehung: 0,1960 g Subst. 10 ccm Methanol, $l=2$ dm,

$$\alpha = +1.03 \quad [\alpha]_D^{15} = +26,28^{\circ}$$

4,215, 3,725 mg Subst.: 10,860, 9,620 mg CO₂, 4,020, 3,545 mg H₂O.

C ₂₈ H ₄₄ O ₄ ·H ₂ O	Ber. C 70,37%	H 10,87%
Gef. "	70,27%, 70,43%	" 10,68%, 10,65%

Das von Krystallen vom Schmelzpunkt 241° getrennte Essigäther-Filtrat wurde durch Abdampfen getrocknet und als 0,1%ige Lösung in Aceton-Benzol (1:1) gelöst, durch eine Säule von Aluminiumoxyd nach Brockmann einlaufen gelassen und das Aluminiumadsorbat mit absolutem Alkohol extrahiert. Aus diesem Alkoholauszug wurden beim Einengen Krystalle gewonnen und aus Alkohol umkrystallisiert. Tafeln vom Schmelzpunkt 250–251°. Ausbeute 30 mg. Dieser Krystall zeigt eine positive Hammarstensehe Reaktion.

3,385, 4,110 mg Subst.: 8,800, 10,680 mg CO₂, 3,070, 3,745 mg H₂O.

C ₂₈ H ₄₄ O ₄ ·H ₂ O	Ber. C 70,37%	H 10,87%
Gef. "	70,90%, 70,87%	" 10,15%, 10,20%

Das die von einer Säule von Aluminiumoxyd nicht adsorbierte Substanz enthaltende Filtrat wurde von Benzol u. Aceton befreit und der Rückstand aus Essigäther umkrystallisiert. Tafeln vom Schmelzpunkt 246–248°. Ausbeute 40 mg. Der Krystall zeigt keine Hammarstensehe Reaktion.

4,365, 4,390 mg Subst.: 11,290, 11,340 mg CO_2 , 4,210, 4,190 mg H_2O .

$\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Ber. C 70,37%	H 10,87%
Gef. "	70,54%, 70,45%	" 10,79%, 10,68%

2) Tetraketo-isohomocholan $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_4$ (II).

4,0 g Tetraoxy-isohomocholan wurden in 50 ccm Eisessig gelöst, in Zimmertemperatur mit 40 ccm einer 10%igen Chromsäureeisessiglösung tropfenweise versetzt und 2 Stunden lang stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde mit einem Liter Eiswasser verdünnt, eine Nacht stehen gelassen, von der dabei entstandenen Fällung abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das Pulver wurde in der Hülse im Soxhletapparat mit Äther einen Tag lang extrahiert. Der Ätherauszug wurde abgedampft und der Rückstand aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 173° . Ausbeute 2,3 g. Der Krystall ist in Essigäther, Eisessig, Aceton u. Chloroform leicht, in Alkohol schwer und in Äther sehr schwer löslich. Der Krystall zeigt eine positive Jaffesche Reaktion.

3,195 mg Subst.: 8,765 mg CO_2 , 2,605 mg H_2O .

$\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_4$	Ber. C 74,94%	H 9,07%
Gef. "	74,82 "	" 9,12 "

0,1 g Tetraketo-isohomocholan wurde in 30 ccm absolutem Alkohol gelöst, mit 2 ccm einer normalen Natronlaugelösung versetzt, auf dem Wasserbade 2 Stunden lang gekocht, in 800 ccm Eiswasser eingegossen und eine Nacht stehen gelassen. Die dabei entstandene Fällung wurde abfiltriert, gut gewaschen und aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 173° . Ausbeute 60 mg. Keine Schmelzpunkt-depression mit dem ursprünglichen Tetraketo-isohomocholan vom Schmelzpunkt 173° . Dieses ist also durch Alkali unverändert geblieben.

Tetraketo-isohomocholan-tetraoxim.

0,1 g Tetraketo-isohomocholan wurde in 20 ccm Alkohol gelöst, mit 0,1 g Hydroxylaminchlorhydrat im 10 ccm Alkohol versetzt, auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erwärmt, die Reaktionslösung in 60 ccm Eiswasser eingegossen und die dabei abgeschiedene Fällung abfiltriert. Prismen vom Schmelzpunkt 238° . Ausbeute 55 mg. Der Krystall ist in Alkohol leicht, aber in Aceton, Essig-

äther und Äther sehr schwer löslich.

3,060 mg Subst.: 0,319 ccm N (27° , 758 mm)

$C_{25}H_{36}(NOH)_4$ Ber. N 12,17% Gef. N 11,83%

3) α -Tetraoxy-isohomocholan $C_{25}H_{44}O_4$ (III).

0,7 g Platinoxid in 15 ccm Eisessig wurde unter Durchleiten von Wasserstoff mit diesem gesättigt und mit 0,7 g Tetraketo-isohomocholan in 15 ccm Eisessig versetzt und mit Wasserstoff 5 Stunden lang durchgeleitet, wobei die Lösung ca. 4 Mole Wasserstoffe aufnahm. Die Reaktionslösung wurde von Platinoxid abfiltriert und die Lösung in 600 ccm kaltes Wasser eingegossen.

Die dabei abgeschiedene Fällung wurde nach einer Nacht abfiltriert, mit Wasser gut gewaschen und getrocknet. Diese Masse wurde aus Essigäther oder Aceton mehrmals umkrystallisiert. Rhombische Tafeln vom Schmelzpunkt $230-231^{\circ}$. Ausbeute 0,2 g. Der Krystall zeigt eine positive Hammarstensehe Reaktion und seine Lösung wurde durch eine 1%ige Digitoninlösung nicht gefällt.

3,585 mg Subst.: 9,700 mg CO_2 , 3,400 mg H_2O .

$C_{25}H_{44}O_4$	Ber. C 73,47%	H 10,86%
	Gef. " 73,79 "	" 10,61 "

4) Isohomocholan $C_{25}H_{44}$ (V).

1 g Tetraketo-isohomocholan wurde in 50 ccm Eisessig gelöst, unter Zusatz von 40 g amalgamiertem Zink auf dem Sandbad 9 Stunden erwärmt und zwar inzwischen dreimal zusammen mit 140 ccm konzentrierter Salzsäure und 150 ccm Eisessig versetzt.

Die Reaktionslösung wurde nach einer Nacht von der dabei abgeschiedenen öligen Substanz abfiltriert, in Äther aufgenommen, die Ätherlösung nach dem Waschen mit Wasser abgedunstet und die dabei abgeschiedene ölige Substanz aus absolutem Alkohol u. wasserfreiem Äther umkrystallisiert.

Prismen vom Schmelzpunkt $50-51^{\circ}$. Ausbeute 0,15 g. Die Substanz ist in Essigäther, Äther und Chloroform leicht und in Methanol, Äthanol u. Aceton sehr schwer löslich.

Spec. Drehung: 0,0448 g Subst.: 5 ccm Chloroform,

$l=1$ dm, $\alpha = +0,23$ $[\alpha]_D^{25} = +25,67^{\circ}$

3,015 mg Subst.: 9,585 mg CO₂, 3,440 mg H₂O.

C ₂₅ H ₄₄	Ber. C 87,12%	H 12,88%
	Gef. " 86,80 "	" 12,76 "

Dieses Isohomocholan schmilzt bei der Mischprobe mit dem durch Synthese aus Cholansäure gewonnenen Homocholan vom Schmelzpunkt 75° bei 37–40°. Die beiden Homocholane sind also stereoisomer.

5) α -Iso-norcholsäure C₂₃H₃₈O₅ (IV).

Tetraoxy-isohomocholan wurde weder durch Einwirkung von Permanganat noch von Bleitetraacetat angegriffen. Somit wurde die Chromsäure in der Wärme auf das Tetraoxy-isohomocholan einwirken gelassen und als Oxydationsprodukt α -Iso-norcholsäure gewonnen.

Tetraoxy-isohomocholan-acetat.

4 g Tetraoxy-isohomocholan wurden in 60 cem wasserfreiem Pyridin gelöst und unter Zusatz von frisch destilliertem Essigsäureanhydrid auf dem Wasserbade bei 90° 30 Stunden lang erwärmt. Die Reaktionslösung wurde in 1 Liter kaltes Wasser eingegossen, eine Nacht stehen gelassen, die dabei abgeschiedene Fällung in Äther aufgenommen, der Ätherauszug mit einer 2% igen Salzsäurelösung gewaschen, um das Pyridin zu entfernen, und wieder nach dem Waschen mit Wasser der Äther abdestilliert, wobei ein schwach gelb gefärbtes Öl zurückblieb.

Dieses Öl wurde in 300 cem Aceton gelöst, diese Lösung dann durch eine Säule von Aluminiumoxyd einlaufen gelassen und das dabei erhaltene farblose klare Filtrat von Aceton abdestilliert. Dabei wurde eine farblose glashelle ölige Substanz erhalten, die in allen Lösungsmitteln leicht löslich, aber daraus nicht krystallisierbar war. Das getrocknete Pulver schmilzt bei 77–80°. Ausbeute 3.5 g. Die Substanz ist in Äthanol, Methanol, Aceton, Äther und Essigäther löslich.

3.5 g Tetraoxy-isohomocholanacetat wurde in 50 cem Eisessig gelöst und unter Erwärmung auf dem Wasserbade bei 90–95° mit 50 cem einer 10% igen Chromsäureeisessiglösung allmählich tropfenweise versetzt und 2 Stunden lang erwärmt. Die Reaktionslösung wurde in 1 Liter kaltes Wasser eingegossen, nach einer Nacht von

der dabei abgeschiedenen Fällung abfiltriert, mit Wasser gut gewaschen und nach dem Trocknen in Äther aufgenommen. Der Ätherauszug wurde mit einer 5%igen Sodalösung mehrmals ausgeschüttelt und in 2 Fraktionen, eine sodalösliche Säurefraktion und eine ätherunlösliche neutrale Fraktion getrennt.

Neutrale Fraktion:

Der Äther wurde abgedampft, die zurückgebliebene ölige Substanz in 20 ccm einer 5%igen alkoholischen Kalilauge gelöst und auf dem Wasserbade 3 Stunden erwärmt. Das Hydrolysat, die Fällung wurde abgesaugt und getrocknet. Ausbeute 0.1 g. Diese Substanz muss ein ursprüngliches Tetraoxy-isohomocholan sein.

Säurefraktion:

Die Sodalösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und die Fällung aus allen möglichen Lösungsmitteln umzukrystallisieren versucht, wobei aber kein Krystall gewonnen wurde. Somit wurde die Fällung in 20 ccm einer 5%igen Kalilauge gelöst, die Lösung auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erwärmt und von der bei Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure abgeschiedenen Fällung abgesaugt. Diese Fällung wurde in einer 2%igen Ammoniaklösung gelöst, mit einer 5%igen Bariumchloridlösung ausgefällt und eine Nacht stehen gelassen. Die dabei abgeschiedene kleine Menge Fällung wurde abfiltriert, das Filtrat unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und filtriert. Die Fällung wurde getrocknet und aus allen möglichen Lösungsmitteln umzukrystallisieren versucht, aber dabei kein Krystall gewonnen. Ausbeute 0.15 g. Die Fällung ist in Äthanol, Methanol, Essigäther, Aceton, Eisessig, Chloroform und Benzol leicht und in Äther schwer löslich. Aus Äther krystallisiert die Substanz in Tafeln vom Schmelzpunkt 210–211°. Ausbeute 40 mg.

Der Krystall zeigt eine positive Hammarstensche, aber keine Myliusche Reaktion. Bei Liebermannscher Reaktion zeigt der Krystall eine braunrote Farbe mit starker Fluoreszenz. Schmelzpunktdepression mit reinere Cholsäure vom Schmelzpunkt 198° und mit reiner Norcholsäure vom Schmelzpunkt 187°.

3,100 mg Subst.: 7,990 mg CO₂, 2,770 mg H₂O.

C ₂₈ H ₃₈ O ₆	Ber. C 69,99%	H 9,71%
	Gef. " 70,29 "	" 10,00 "

Diese Säure wurde in üblicher Weise mit Diazomethan verestert und der Ester aus Äther umkrystallisiert. Tafeln vom Schmelzpunkt 218–220°. Deutliche Schmelzpunktdepression mit dem Cholsäuremethylester vom Schmelzpunkt 152° und mit Norcholsäure-methylester vom Schmelzpunkt 155°.

III. Schwefelsäurekomponente.

Das von der Säure- sowie neutralen Fraktion befreite Filtrat wurde mit 200 ccm einer 10%igen Salzsäurelösung versetzt, auf dem Wasserbad erwärmt und weiter mit 200 ccm einer 10%igen Bariumchloridlösung versetzt und weiter eine Stunde lang erwärmt. Die dabei abgeschiedene weisse Fällung wurde mit einem aschenfreien Filter filtriert, gut gewaschen, getrocknet und im Tiegel bis zum Glühen erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Rückstand gewogen, wobei 30 g Bariumsulfat erhalten wurde.

Zum Schluss möchte ich nicht verfehlen, Herrn Prof. Dr. T. Kazuno für seine freundliche Leitung und Unterstützung meiner Arbeit meinen herzlichen Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Asikari, H. (1939): J. of Bioch., **29**, 319.
 Hammarsten, O. (1909): Z. Physiol. Chem., **61**, 495.
 Iwaki, K. (1942): J. of Bioch., **35**, 225.
 Mabuti, H. (1941): J. of Bioch., **33**, 117, 131.
 Kazuno, T. (1940): Z. Physiol. Chem., **266**, 11.
 Makino, H. (1933): Z. Physiol. Chem., **220**, 49.
 Ohta, K. (1939): Z. Physiol. Chem., **259**, 53.
 Shimizu, T. u. Kazuno, T. (1936/37): Z. Physiol. Chem., **239**, 67; **244**, 167.
 Shimizu, T. u. Oda, T. (1934): Z. Physiol. Chem., **227**, 74.

ÜBER DIE GALLENSÄUREN VON WASSER-SALAMANDERN.

II. Über die Synthese von Homocholan $C_{25}H_{44}$ und Bisnor-sterocholan $C_{26}H_{46}$ und Isohomocholan aus Tetraoxy-isohomocholan aus der Galle von Wassersalamandern.

VON

YASUYA OKASAKI.

(Aus dem Biochemischen Institut zu Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

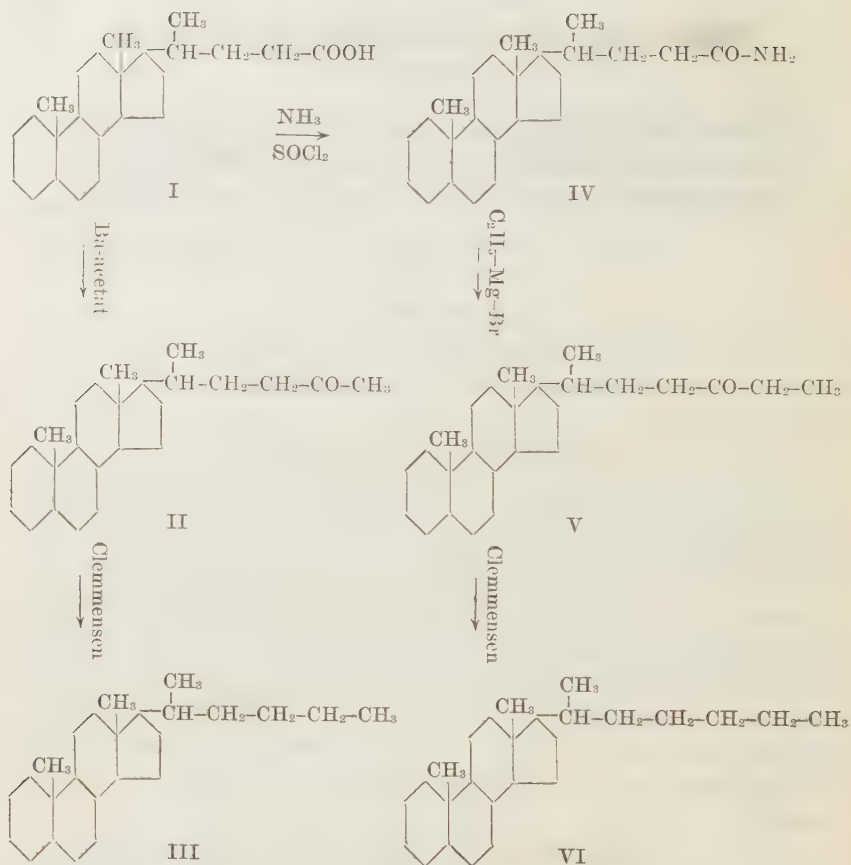
(Eingegangen am 22. April 1942.)

In der vorigen Mitteilung (Okasaki 1942) wurde berichtet, dass das Tetraoxy-isohomocholan von der Formel $C_{25}H_{44}O_4$ oder $C_{26}H_{46}O_4$ den Hauptbestandteil der Galle von Wassersalamandern ausmacht, welches in der Galle als Schwefelsäureester vorkommt. Das durch Oxydation des Tetraoxy-isohomocholans, dann durch energische Reduktion erhaltene Isohomocholan $C_{25}H_{44}$ oder $C_{26}H_{46}$ ist um 8 Wasserstoffe ärmer als die ihm entsprechenden Paraffine $C_{25}H_{52}$ oder $C_{26}H_{54}$. Somit wurde festgestellt, dass das Isohomocholan ebenso wie die Steroide vier hydrierte Ringe im Molekül enthält.

Um das Grundskelett des Tetraoxy-isohomocholans aus der Galle von Wassersalamandern festzulegen, wurde Homocholan $H_{25}H_{44}$ bzw. Bisnor-sterocholan $C_{26}H_{46}$ aus Cholansäure synthetisiert und mit denen aus Tetraoxy-isohomocholan von der Galle von Wassersalamandern miteinander verglichen.

Durch Destillation des cholansäuren Bariums (I) mit Bariumacetat wurde ein in Prismen krystallisiertes und bei 113° schmelzendes Norcholyl-methylketon (II) von der Formel $C_{25}H_{42}O$ erhalten. Dieses Keton erwies sich als identisch mit dem durch stufenweisen Abbau der Cholansäure nach Grignard erhaltenen Keton (Wieland 1926) vom Schmelzpunkt 113° .

Durch Clemmensen'sche Reduktion des Norcholyl-methylketons



wurde ein Nadelkristall vom Schmelzpunkt 75° und von spezifischer Drehung $+27,95$ gewonnen. Diese neue Substanz von der Formel $\text{C}_{25}\text{H}_{44}$ wurde als Homocholan (III) bezeichnet und musste das Grundskelett des neuen Steroides aus der Galle von Wassersalamandern sein.

Erst durch Behandlung der Cholansäure mit Thionylchlorid, dann mit Ammoniak wurde Cholansäureamid (IV) eines prismatischen Nadelkristalls vom Schmelzpunkt 189° und einer spezifischen Drehung $+28,28^\circ$ erhalten. Dieses Amid wurde mit Grignardschem Reagens, Äthylmagnesiumbromid behandelt, wobei ein Keton

als Semicarbazon isoliert wurde. Der aus dem Semicarbazon durch Zerlegung mit Salzsäure erhaltene prismatische Norcholyl-äthylketon-krystall (V) vom Schmelzpunkt 94° u. von einer spezifischen Drehung $+24,12^{\circ}$ wurde der Clemmensen'schen Reduktion unterworfen und dabei ein prismatische Reduktionsprodukt vom Schmelzpunkt 74° und $[\alpha]_D = +27,19^{\circ}$ erhalten. Diese Substanz von der Formel $C_{26}H_{46}$ wurde als Bisnor-sterocholan (VI) bezeichnet.

Die beiden synthetisierten Steroide Homocholan (III) und Bisnorsterocholan (VI) zeigen je mit dem neuen vom Tetraoxy-isohomocholan aus Wassersalamandern abgeleiteten Cholan vom Schmelzpunkt 51° eine Schmelzpunktdepression. Letzteres gehört also nach seinen Eigenschaften weder dem aus Cholansäure abgeleiteten Homocholan $C_{25}H_{44}$ vom Schmelzpunkt 75° noch dem Bisnor-sterocholan $C_{26}H_{46}$ vom Schmelzpunkt 74° an, doch scheint es auf Grund des Analysenwertes mit einem Homocholan von der Formel $C_{25}H_{44}$ übereinzustimmen. Ob und wie das Cholan vom Schmelzpunkt 51° aus Tetraoxy-isohomocholan vom neuen synthetisierten Homocholan $C_{25}H_{44}$ (III) vom Schmelzpunkt 75° sterisch verschieden ist, muss in weiteren genauen Studien ausgeführt werden. Der Unterschied zwischen beiden beruht höchstwahrscheinlich darauf, dass die Ringe B und C des neuen aus Tetraoxy-isohomocholan abgeleiteten Isohomocholanmoleküls eine andere Verknüpfung wie Cholansäure darstellen dürften, genau wie es bei der α - u. β -Apochenodesoxycholsäure (Yamasaki u. Takahashi 1938) der Fall war.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Synthese von Homocholan $C_{25}H_{44}$.

1. Norcholyl-methylketon-semicarbazone.

2 g Cholansäure wurden in 100 ccm absolutem Alkohol gelöst, unter Indikator Phenolphthalein mit einer gesättigten Barytlösung neutralisiert, die dabei entstandene weisse Fällung von cholan-saurem Barium abgesaugt und im Zimmertemperatur getrocknet. 3 g gut pulverisiertes Bariumcholanat wurden mit 10 g Bariumacetat gut gemischt, bei 400° u. unter Druck von 15 mm im Vakuum

destilliert, die dabei erhaltene braune ölige Masse in Äther aufgenommen und der Ätherauszug abgedampft.

Der Rückstand wurde in 100 ccm absolutem Alkohol erwärmend gelöst, mit 5 g Semicarbazid in 50 ccm absolutem Alkohol versetzt und auf dem Wasserbade erwärmt. Beim Abdampfen der alkoholischen Lösung zur Hälfte ihres Volumens schied sich ein rosettenförmig gruppierter Nadelkrystall ab, welcher in Alkohol und Äther schwer löslich ist. Ausbeute 0,5 g. Der aus Eisessig umkrystallisierte Krystall schmilzt bei 223°.

3,560 mg Subst.: 0,294 ccm N (11°, 769 mm)

$C_{20}H_{45}ON_3$ Ber. N 10,12% Gef. N 10,04%

2. Norcholyl-methylketon.

4 g Semicarbazon wurden in 200 ccm Aceton gelöst, unter Zusatz von 20 ccm einer 10%igen Salzsäure auf dem Wasserbade eine Stunde lang erwärmt, mit 500 ccm Wasser versetzt und das Aceton abgedampft, wobei ein gelber Niederschlag auftrat. Dieser abfiltrierte Niederschlag wurde aus Alkohol umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 113°. Ausbeute 2 g.

spezifische Drehung: 0,0634 g Subst. in 10 ccm Chloroform,

$l = 2 \text{ dm, } \alpha = -0,45^\circ \quad [\alpha]_D^{15} = -37,85^\circ$

3,835, 3,630 mg Subst.: 11,780, 11,135 mg CO_2 , 4,045, 3,810 mg H_2O .

$C_{23}H_{42}O$ Ber. C 83,80 H 11,73

Gef. " 83,77, 83,66 " 11,81, 11,71.

3. Homocholan $C_{25}H_{44}$.

1,5 g Norcholyl-methylketon wurde in 50 ccm Eisessig gelöst, mit 30 g amalgamiertem Zink versetzt und unter Zusatz von Eisessig-Salzsäurelösung (50 ccm Eisessig + 50 ccm einer konz. Salzsäure vom spez. Gew. 1,2) dreimal auf dem Sandbade 6 Stunden lang erhitzt.

Das Reaktionsgemisch wurde eine Nacht stehen gelassen, die dabei abgeschiedene harzige Masse abfiltriert und aus absolutem Alkohol umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzpunkt 75°. Der Krystall ist in Alkohol schwer, aber in Äther leicht löslich. Ausbeute 0,2 g.

Spez. Drehung: 0,1145 g Subst. in 10 cc Alkohol-Äther (1:1),

$l = 2 \text{ dm, } \alpha = +0,64^\circ \quad [\alpha]_D^{14} = +27,95^\circ$.

3,665, 3,790 mg Subst.: 11,690, 12,100 mg CO₂, 4,255, 4,350 mg H₂O.

C ₂₅ H ₄₄	Ber. C 87,12	H 12,88
	Gef. " 86,98, 87,07	" 12,99, 12,84.

Dieses Homocholan C₂₅H₄₄ vom Schmelzpunkt 75° zeigt bei der Mischprobe mit dem vom Tetraoxy-isohomocholan von der Formel C₂₅H₄₄O₄ (bzw. C₂₆H₄₆O₄) abgeleiteten Cholan vom Schmelzpunkt 51° deutliche Schmelzpunktdepression und zwar schmilzt es bei 37–40°.

Synthese von Bisnor-sterocholan C₂₆H₄₆.

1. Cholansäureamid.

10 g Cholansäure wurden in einer kleinen Menge von wasserfreiem Äther gelöst, mit 30 g Thionylchlorid versetzt und unter Abschluss von Feuchtigkeit mittelst des Chlorkalkrohres 4 Stunden lang in Zimmertemperatur stehen gelassen.

Das Reaktionsgemisch wurde auf dem Wasserbade bei 50–60° erwärmend im Vakuum destilliert, der Destillationsrückstand getrocknet und pulverisiert. Das Pulver wurde in 30%iger konzentrierter Ammoniaklösung gelöst, auf dem Wasserbade bei 40–50° 30 Minuten lang erwärmt und eine Nacht stehen gelassen. Die dabei abgeschiedene gelbe Fällung wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und zu Pulver getrocknet. Dieses Pulver wurde aus Aceton umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 189°. Ausbeute 8,5 g. Die Substanz ist in Chloroform, Benzol, Alkohol u. Aceton sehr leicht löslich, aber in Äther u. Essigäther fast unlöslich.

Spez. Drehung: 0,0725 g Subst. in 10 ccm Chloroform,

$l = 2$ dm, $\alpha = +0,41$ $[\alpha]_D^{25} = +28,28^\circ$.

4,760 mg Subst.: 0,167 ccm N (20°, 766 mm)

C₂₄H₄₁ON Ber. N 3,90% Gef. N 4,12%

2. Norcholy-l-aethylketon-semicarbazon.

3 g Magnesium wurden in 100 ccm wasserfreiem Äther mit 15 g Bromäthyl versetzt, eine Stunde lang auf dem Wasserbade erwärmt und zu dieser Grignardschen Lösung 8 g Cholansäureamid in 150 ccm wasserfreies Benzol hineingetan und auf dem Wasser-

bade bei 70–80° weiter 5 Stunden lang erwärmt. Von dieser Reaktionslösung wurde Benzol und Äther gedampft und der Rückstand im Exsiccator getrocknet.

Das getrocknete Pulver wurde unter Eiskühlung in einer kleinen Menge einer 10%igen Schwefelsäurelösung digeriert, der Rückstand mit Äther ausgezogen, der Ätherauszug mit Wasser gewaschen und mit einer 5%igen Natriumhyposulfitlösung geschüttelt, um das Brom zu entfernen, und wieder mit Wasser gewaschen. Der getrocknete Ätherauszug wurde nach dem Abdampfen des Äthers in 100 ccm absolutem Alkohol gelöst, mit 5 g Semicarbazid in 50 ccm absolutem Alkohol versetzt und auf dem Wasserbade 4 Stunden lang erwärmt. Die Reaktionslösung wurde nach dem Einengen zu einem Drittel ihres Volumens abgekühlt und die dabei abgeschiedenen Krystalle abgesaugt. Diese wurden aus absolutem Alkohol und Benzol umkrystallisiert. Schuppen vom Schmelzpunkt 201°. Ausbeute 3 g. Die Krystalle sind in Äther, Essigäther, Aceton und Chloroform fast unlöslich.

3,090 mg Subst.: 0,265 ccm N (19°, 769 mm)

$C_{27}H_{47}ON_3$ Ber. N 9,74% Gef. N 10,14%

3. Norechyl-äthylketon.

3 g Semicarbazon wurden in 150 ccm Aceton gelöst, mit 15 ccm einer 10%igen Salzsäurelösung versetzt und auf dem Wasserbade 30 Minuten lang erwärmt. Die Reaktionslösung wurde mit 500 ccm Wasser verdünnt, das Aceton abgedampft, die dabei abgeschiedene gelbe Fällung abfiltriert, mit Wasser gut gewaschen und getrocknet. Diese Substanz wurde aus Aceton umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 94°. Ausbeute 1,6 g. Die Substanz ist in Äther, Essigäther, Eisessig, Chloroform und Alkohol sehr leicht löslich.

Spezifische Drehung: 0,1223 g Subst. in 10 ccm Chloroform,

$l=2$ dm, $\alpha = +0,59$, $[\alpha]_D^{16} = +24,12^\circ$.

3,460 mg Subst.: 10,600 mg CO_2 , 3,630 mg H_2O .

$C_{26}H_{44}O$ Ber. C 83,80 H 11,91
Gef. " 83,55 " 11,74.

4. Bisnor-sterocholan $C_{26}H_{46}$.

1,5 g Norechyl-äthylketon wurde in 100 ccm Eisessig mit 40 g

amalgamiertem Zink versetzt, weiter unter Zusatz von 70 ccm konzentrierter Salzsäure (Spez. Gew. 1,2) und 100 ccm Eisessig dreimal 8 Stunden lang auf dem Sandbade erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde eine Nacht stehen gelassen, die dabei abgeschiedene weisse harzige Masse in Äther aufgenommen, der Ätherauszug mit Wasser gewaschen, getrocknet und der Äther abgedampft. Der Rückstand wurde aus einem Gemisch von absolutem Alkohol und wasserfreiem Äther (1:1) oder aus einem Gemisch von Eisessig und wasserfreiem Äther (1:1) umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 74°. Ausbeute 0,5 g. Der Krystall ist in Äther u. Chloroform sehr leicht, aber in Essigäther, Alkohol u. Eisessig sehr schwer löslich.

Spezifische Drehung: 0,1220 g Subst. in 10 ccm Chloroform,

$l = 2 \text{ dm}$, $\alpha = +0,66$, $[\alpha]_D^{15} = +27,19^\circ$.

3,650 mg Subst.: 11,650 mg CO₂, 4,130 mg H₂O.

C ₂₆ H ₄₆	Ber. C 87,07%	H 12,93%
	Gef. " 87,05 "	" 12,66 "

Dieses Bisnor-sterocholan C₂₆H₄₆ vom Schmelzpunkt 74° zeigt mit dem vom Tetraoxy-isohomocholan abgeleiteten Cholan vom Schmelzpunkt 51° eine Schmelzpunktdepression und zwar schmilzt es bei 33–39°.

Zum Schluss möchte ich Herrn Prof. Kazuno für seine freundliche Leitung und Unterstützung bei meiner Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

LITERATUR.

- Okasaki, Y. (1942): JI. of Bioch., **36**, 65.
 Wieland, H., Schlichting, O. u. Jacobi, R. (1926): Z. physiol. Chem., **161**, 80.
 Yamasaki, K. u. Takahashi, K. (1938): Z. Physiol. Chem., **256**, 21.

ÜBER DIE EXTRAKTIVSTOFFE DER LEBER VON WASSERSALAMANDERN (DIEMYCTYLUS PYRRHOGASTER) IM WINTERSCHLAF.

VON

YASUYA OKASAKI.

(Aus dem Biochemischen Institut zu Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 22. April 1942.)

Um den intermediären Stoffwechsel der Proteine bei Amphibien zu erkennen, wurden zuerst die Extraktivstoffe der Leber von Wassersalamandern im Winterschlaf untersucht. Was den Extraktivstoff der Leber anbetrifft, so wurden bereits von verschiedenen Forschern unter verschiedener Bedingung Untersuchungen angestellt.

Neuerdings haben Sibuya (1931) bei der Krötenleber zur Sommerzeit und Makino (1933, 1934) bei derselben zur Winterzeit deren stickstoffhaltige Extraktivstoffe untersucht und sind zu dem interessanten Ergebnis gekommen, dass die Leber während der Wachzeit im Extraktivstoff viel mehr Tyrosin enthält als im Winterschlaf, während sie im Winterschlaf reichlicher Leucin enthält als in der Sommerzeit, welches letzteres nach Fuzita (1932) u. Dakin (1913) wohl ein Glykogenbildner sein dürfte.

Obwohl der durch Temperatursteigerung hervorgerufene chemische Vorgang bei Fieber und bei steigender Aussentemperatur nicht ganz der gleiche ist, wie Inada (1929) bei der Untersuchung der chemischen Zusammensetzung der Leber im Fieber betont hat, so ermöglicht der Unterschied zwischen dem Gehalt an Aminosäuren in der Leber während der Wachzeit und Winterschlafzeit doch eine Erkennung des Zustands des Eiweisstoffwechsels in der Fieberzeit.

In diesem Sinne habe ich den stickstoffhaltigen Extraktivstoff der Leber von Wassersalamandern im Winterschlaf untersucht und

gefunden, dass in der Leber das Leucin, als Glykogenbildner betrachtet, der Menge nach vorherrschend und dann Asparaginsäure enthalten ist. Die Ergebnisse sind der Übersichtlichkeit halber in Tabelle I zusammengestellt.

TABELLE I.

N-haltige Extraktivstoffe.		
	g	%
Tyrosin	0,2540	0,063
Leucin	3,7000	0,925
Isoleucin	vorhanden	—
Prolin	0,0927	0,023
Alanin	vorhanden	—
Valin	"	—
Phenylalanin	0,1250	0,031
Asparaginsäure	0,9650	0,241
Thymin-Uracil	0,0265	0,006
Adenin	0,1015	0,025
Hypoxanthin	vorhanden	—
Xanthin	0,0947	0,024
Histidin	0,0360	0,009
Bernsteinsäure	0,0262	0,006

Es ist bemerkenswert, dass unter den Aminosäuren *l*-Asparaginsäure bzw. ihre Grundsubstanz, Bernsteinsäure, in ziemlich reichlicher Menge vorkommt. Was die Bedeutung der Bernsteinsäure im Organismus anbetrifft, so wurde von Szent-György u. seinem Mitarbeitern (1935/36) und von Breusch (1937–38) behauptet, dass die Oxydoreduktion im Kohlehydratstoffwechsel durch C₄-Dicarbonsäure, wie Bernsteinsäure, Apfelsäure, Fumarsäure u. Maleinsäure katalysiert wird, indem im Kreislauf des Oxydoreduktionssystems Citronensäure gebildet wird.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

4 kg frisch herausgeholte, von Blut und Bindegewebe befreite

Leber von 16400 Wassersalamandern wurden mit der Fleischhackmaschine zu Brei zerkleinert, mit der dreifachen Menge Wasser unter Erwärmung bei 37–41° eine Stunde lang digeriert und koliert. Der Rückstand wurde im Mörser zerrieben und in genau gleicher Weise wie vorher noch zweimal behandelt. Das dabei erhaltene Kolat von 20 Litern wurde mittelst einer 20%igen Tanninlösung enteiwisst. Diese Lösung wurde im Vakuum zu 400 ccm eingengt und 2 Wochen lang im Eisschrank stehen gelassen. Die dabei abgeschiedene gelbe Fällung wurde abgesaugt.

l-Tyrosin.

Die Fällung wurde in ammoniakalischem Wasser heiss gelöst und mittelst verdünnter Salzsäure neutralisiert. Beim Abkühlen schieden sich seideglänzende Nadelkrystalle vom Schmelzpunkt 312° ab. Ausbeute 0,254 g. Der Krystall zeigte eine Farbenreaktion für Tyrosin.

Spez. Drehung: 0,049 g Subst., 10 ccm Wasser, $l=1$ dm,

$$\alpha = -0,08, \quad [\alpha]_D^{24} = -8,07^\circ$$

0,0540 g Subst.: verbrauchten 3,10 ccm $N/10$ H_2SO_4

$C_9H_{11}O_3N$ Ber. N 8,18% Gef. N 8,04%.

l-Leucin.

Aus dem von Tyrosinkrystallen befreiten Filtrat wurden beim Einengen Blättchenkrystalle erhalten und aus heissen Wasser mehrmals umkrystallisiert. Dünne glänzende Blättchen vom Schmelzpunkt 293°. Ausbeute 1,855 g.

Spez. Drehung: 0,100 g Subst., 10 ccm Wasser, $l=1$ dm,

$$\alpha = -0,21, \quad [\alpha]_D^{24} = -10,67^\circ$$

4,140 mg Subst.: 0,392 ccm N (29°, 761 mm)

$C_6H_{13}O_2N$ Ber. N 10,69% Gef. N 10,72%.

Bernsteinsäure:

Die von Tyrosin und Leucin befreite Mutterlauge als solche oder nach Ansäuern mit Schwefelsäure wurde mit dem Kumagawa-Sutoschen Apparat mit Äther 72 Stunden lang extrahiert, um die fettige Substanz zu entfernen.

Der Ätherauszug wurde nach dem Verdampfen des Äthers mit Zinkcarbonat neutralisiert und abfiltriert. Das Filtrat wurde mit

einer 10%igen Eisenchloridlösung 4 Stunden lang erwärmt und von der Fällung abgesaugt. Der Rückstand wurde in Wasser mittelst Bariumcarbonatlösung neutralisiert, eine Nacht stehen gelassen und filtriert.

Das Filtrat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert. Der nach dem Verdampfen des Äthers zurückgebliebene Rückstand wurde aus heissem Wasser umkrystallisiert. Weisse Krystalle vom Schmelzpunkt 182°. Ausbeute 0,0262 g.

3,995 mg Subst.: 5,960 mg CO₂, 1,895 mg H₂O.

C ₄ H ₆ O ₄	Ber. C	40,67%	H	5,13%
	Gef. "	40,69 "	"	5,31 "

Die von Fett und Bernsteinsäure befreite Mutterlauge wurde mit Schwefelsäure versetzt, bis die Lösung 5% davon enthalten konnte, mit einer 20%igen Phosphorwolframsäurelösung vollständig gefällt und die Fällung abgesaugt.

I. Aminosäuren- u. Pyrimidinbasen-fraktion.

Das von der Phosphorwolframsäurefällung abfiltrierte Filtrat wurde durch Baryt vom Überschuss der Phosphorwolframsäure und von Schwefelsäure befreit und durch Zusatz von Sublimatlösung gefällt. Diese Fällung wurde als Pyrimidinbasenfraktion und ihr Filtrat als Aminosäurefraktion behandelt.

1) Pyrimidinbasen.

Die Sublimatfällung wurde in Wasser suspendiert, durch Schwefelwasserstoff zerlegt und abfiltriert. Das Filtrat wurde stark eingeeengt, eine Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen und die dabei abgeschiedene Krystallmasse aus heissem Wasser mehrmals umkrystallisiert. Nadeln oder Blättchen vom Zersetzungspunkt 320°. Ausbeute 0.0265 g. Die Krystalle sublimieren, zeigen eine positive Weidelsche und Wheeler-Johnsonsche Reaktion und addieren Brom. Diese Krystalle scheinen also ein Gemisch von Uracil und Thymin zu sein.

2) Aminosäuren.

Das von der Pyrimidinkörperfällung befreite Filtrat wurde von Hg durch Schwefelwasserstoff, vom Überschuss an Baryt

mittelst verdünnter Schwefelsäure befreit und die Lösung im Vakuum zu Syrup eingeengt. Diese Masse wurde nach der Estermethode von Fischer (1901) der fraktionierten Destillation unterworfen und die Aminosäuren der verschiedenen Fraktionen (5 Frakt.) nach Shimizu (1921) als Kupfersalz getrennt und nach der Analyse identifiziert, wie in Tabelle I und II gezeigt wird.

TABELLE II.

Name	Krystallform	Zer- setzpt.	Analysedaten
<i>l</i> -Prolin (C ₅ H ₉ NO ₂) ₂ Cu	Blättchen	260°	3,300 mg Subst.: 0,275 ccm N (31°, 760 mm) Ber. N 9,55% Gef. N 9,35%
<i>dl</i> -Prolin (C ₅ H ₉ NO ₂) ₂ Cu			3,430 mg Subst.: 0,284 ccm N (30°, 760 mm) Ber. N 9,55% Gef. N 9,42%
<i>d</i> -Alanin	Blättchen	252°	
<i>l</i> -Leucin (C ₆ H ₁₂ NO ₂) ₂ Cu	Schuppen	285°	3,910 mg Subst.: 0,304 ccm N (30°, 758 mm) Ber. N 8,65% Gef. N 8,74%
<i>d</i> -Isoleucin	Blättchen	280°	
<i>d</i> -Valin	Blättchen	310°	
<i>l</i> -Phenylalanin C ₉ H ₁₁ NO ₂ · HCl	Blättchen	270°	0,055 g Subst.: 2,65 ccm N/10 H ₂ SO ₄ Ber. N 6,95% Gef. N 6,75%
<i>l</i> -Asparaginsäure C ₄ H ₇ O ₄ N	Tafeln	267°	2,360 mg Subst.: 0,216 ccm N (27°, 765 mm) Ber. N 10,54% Gef. N 10,48%

II. Basenfraktion.

Die Phosphorwolframsäurefällung wurde nach der von Shimizu (1921) modifizierten Methode von Krüger (1899, 1902) u. Kossel u. Kutscher (1900) bearbeitet und zwar die Basenlösung durch Fällung mittelst Silbernitratlösung in zwei Fraktionen getrennt, wobei die Fällungsfraction Purinbasen und die Filtrat-fraction Hexonbasen enthalten sollten.

1) Purinbasen.

Aus der Silbernitratfällung wurde nach dem Verfahren von

Shimizu Xanthin frei, Adenin u. Hypoxanthin als Pikrat isoliert und zum Teil durch Analyse identifiziert, wie aus den Tabellen I und III ersichtlich ist.

TABELLE III.

Basen	Krystallform	Zersetzpt.	Analysedaten
Adenin-pikrat $C_8H_5N_5 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$	gelbe Nadeln	289°C	0,0545 g Subst.: 11,93 ccm $N/10$ H_2SO_4 Ber. N 30,78% Gef. N 30,65%
Hypoxanthin-pikrat	goldgelbe Tafeln	200°C	
Xanthin $C_5H_4O_2N_4$	Tafeln		0,0365 g Subst.: 9,57 ccm $N/10$ H_2SO_4 Ber. N 36,85% Gef. N 36,71%

2) Hexonbasen.

Aus dem Filtrat der Purinbasenfällung wurde *l*-Histidin durch Fällung erst mittelst Silbernitrat u. Baryt, dann mittelst Sublimat u. Baryt und endlich als Pikrolonat isoliert. Ein gelber prismatischer Krystall vom Zersetzungspunkt 265°.

3,310, 2,760 mg Subst.: 0,666, 0,551 ccm N (30°, 30°, 758, 760 mm)

$C_6H_6N_3O_2(C_{10}H_8N_4O_5)_2$ Ber. N 22,55%
Gef. " 22,61 " 22,51%

LITERATUR.

- Breusch, F. L. (1937-1938): Z. Physiol. Chem., **250**, 262; Biochem. Z., **295**, 125; **297**, 24.
 Dakin, H. D. (1913): J. of Biol. Chem., **14**, 321.
 Fischer, E. (1901): Z. Physiol. Chem., **33**, 151.
 Fuzita, S. (1932): Arb. Med. Fak. Okayama, **3**, 192.
 Inada, J. (1929): Tokyo Igakkai Zassi, **43**, 564.
 Kossel, A. u. Kutscher, F. (1900): Z. Physiol. Chem., **31**, 165.
 Krüger, M. (1899, 1902): Z. Physiol. Chem., **26**, 350; **35**, 153.
 Makino, H. (1933, 1934): J. of Bioch., **18**, 387; **20**, 1.
 Sibuya, S. (1931): J. of Bioch., **14**, 111.
 Shimizu, T. (1921): Bioch. Zschr., **117**, 252.
 Szent-György, A. v. u. seine Mitarbeiter (1935/36): Z. Physiol. Chem., **236**, 1; **244**, 105.

STUDIES ON PROTEASE.

VI. The effect of the addition of various salts on the tryptic activity.

By

KIKUO SUGAI.

(From the Biochemical Institute, Nagasaki Medical College.
Director: Prof. Dr. T. Uchino.)

(Received for publication, April 22, 1942)

INTRODUCTION.

Twenty years ago Nagai (1922) studied the effect of some inorganic salts on a tryptic activity and pointed out that polyvalent cation retarded the action of trypsin, while conversely polyvalent anion brought about its activation. More recently the influence of various salts on a tryptic digestion was studied by many authors, such as Grassmann, Dyckerhoff and Schoenbeck (1929), Michaelis and Stern (1931), Clifford (1933), Vonk, Roelofson and Romijn (1933), Farber and Wynne (1935). Much discrepancy was, however, observed in the results obtained by these authors.

In studying the relative cleavability of various proteins by trypsin, papain and pepsin, Nakamura (1940) and Uchino (1940) compared the initial rate of hydrolysis, since the split products of proteolysis exert an inhibitory effect on the enzyme activity. They thus endeavoured to get a true phase of the relative rates of an enzymic breakdown of proteins. The present investigation was carried out from a similar point of view and deals with the effect of the addition of various inorganic salts on the initial digestion rate of casein by means of trypsin.

EXPERIMENTAL PROCEDURE.

Casein according to Hammarsten (Merck) was employed as a substrate. It contained 9.65 per cent moisture and gave

N, 14.64% of dry weight.

Trypsin and enterokinase were prepared by the method of Waldschmidt-Leitz and his co-workers, described in "Bertho-Grassmann's Biochemisches Praktikum".

Into each of six conical flasks were added 1.0 cc. of the trypsin and enterokinase solution and the flasks were kept in a thermostat at 30°C for 30 minutes for activation. Into the flasks were then added 2.0 cc. of 1 M glycine-NaOH buffer of different pH, 2.0 cc. of salt solution of varying concentration and 4.0 cc. of 2 per cent casein solution, the buffer and the substrate solution having been previously warmed to 30°C. The flasks were placed in a thermostat at 30°C. One of the flasks was immediately titrated and with four flasks further titrations were carried out after the lapse of 10, 20, 40 and 80 minutes respectively. The titrations were accomplished by the formol titration method, using $n/5$ NaOH solution. In this way, the time course of the tryptic digestion in the presence of various salts was followed. The solution in the remaining flask was used for the electrometrical determination of pH. Two fold control experiments, which were performed, using water in place of enzyme on the one hand and using water in place of substrate on the other, gave always negligible results.

It was observed that, on adding some kind of salt a considerable shift of pH takes place, irrespective of the presence of glycine-NaOH buffer in the reaction mixture. Accordingly, the pH of the reaction fluids was always determined with a special precaution and, whenever any shift of pH occurred, the buffer was so adjusted that the required pH of the medium was attained. The effect of salts was thus examined at different pH of the medium as well as at a varying concentration. In cases, where a turbidity due to the precipitation of casein, especially by polyvalent ions, has appeared, the experiments were not carried out, since the initial digestion rate could not be determined with accuracy.

EXPERIMENTAL RESULTS.

1. *Control experiment without salts.* The initial digestion rate of casein by trypsin was at first determined in the absence

of salts and at a different pH value of the medium. The results are shown in Fig. 1.

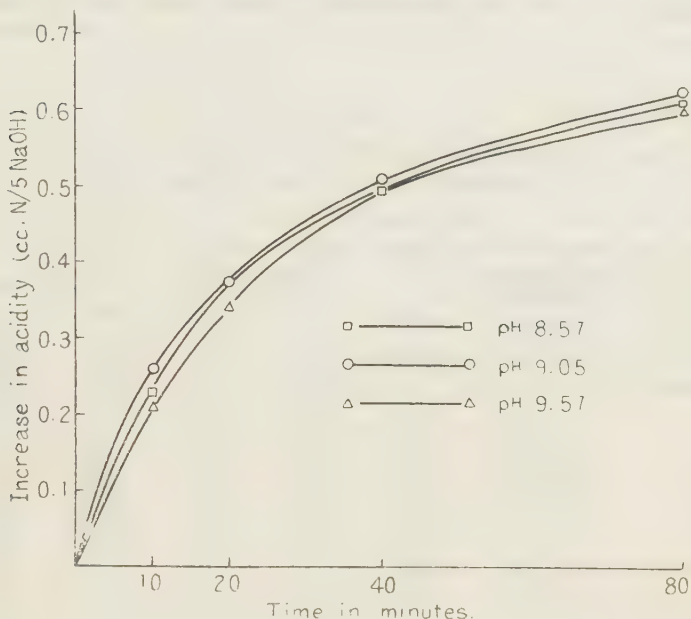


Fig. 1.

As can be seen from the figure, the highest initial hydrolysis rate of casein was attained at pH 9.0. In all the following experiments, this digestion rate of casein without salts was taken as standard. As often as new enzyme or enterokinase solutions were prepared, the activity of these preparations was tested in this manner and the values obtained were taken as a standard.

2. *Effect of NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂, AlCl₃, NaNO₃, Na₂SO₄ and Na₂HPO₄ on the tryptic activity.* The effect of these salts on the tryptic digestion of casein was examined at a different pH of the medium as well as at a varying concentration of the salts. Not only these salts, but also all the other salts tested in the following sections were found to cause no marked shift of optimum pH for the action of trypsin. Accordingly, the comparison was made on the influence of the salts at pH 9.0. In order to express the

relative effects of the salts, the digestion rate of casein without salt, as mentioned in the preceding experiment, was taken as a standard and the value 100 was assigned to it. In Table I are given the relative effects of the salts thus calculated on the tryptic activity.

TABLE I.

Influence of NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂, AlCl₃, NaNO₃, Na₂SO₄
and Na₂HPO₄ on the tryptic activity.

(control = 100)

Salts	Concentrations of salt added (mol)	Time in minutes				pH
		10	20	40	80	
NaCl	5.0×10^{-2}	100.0	102.9	100.0	101.8	8.94
	1.25×10^{-2}	96.0	97.1	100.0	100.0	8.98
	3.13×10^{-3}	96.0	97.1	97.8	100.0	9.02
KCl	5.0×10^{-2}	88.0	91.4	95.6	98.2	8.96
	1.25×10^{-2}	92.0	94.3	95.6	98.2	8.98
	3.13×10^{-3}	100.9	97.1	97.8	100.0	9.02
MgCl ₂	1.25×10^{-2}	100.0	100.0	100.0	101.8	9.06
	3.13×10^{-3}	100.0	94.3	97.8	101.8	9.03
	7.81×10^{-4}	100.0	97.1	100.0	101.8	9.08
CaCl ₂	1.25×10^{-2}	92.0	100.0	102.2	98.2	8.88
	3.13×10^{-3}	95.5	100.0	97.8	98.2	9.03
	7.81×10^{-4}	88.0	100.0	97.8	98.2	9.06
BaCl ₂	1.25×10^{-2}	96.0	94.3	95.6	96.4	8.89
	3.13×10^{-3}	104.0	100.0	95.6	94.5	9.15
	1.56×10^{-3}	100.0	97.1	97.8	100.0	8.98
	7.81×10^{-4}	104.0	102.9	100.0	101.8	8.97
AlCl ₃	3.13×10^{-3}	112.0	108.6	111.1	109.1	9.02
	1.56×10^{-3}	104.0	102.9	104.4	103.6	8.95
	7.81×10^{-4}	104.0	102.9	106.7	105.5	8.97
NaNO ₃	2.0×10^{-1}	100.0	100.0	100.0	100.0	8.98
	5.0×10^{-2}	100.0	100.0	100.0	100.0	9.01
	1.25×10^{-2}	96.0	100.0	100.0	100.0	9.03
Na ₂ SO ₄	2.5×10^{-2}	104.3	103.0	95.9	93.3	8.96
	1.56×10^{-3}	104.3	103.0	95.9	95.0	9.14
	7.81×10^{-4}	117.4	109.1	95.9	95.0	9.17
Na ₂ HPO ₄	1.25×10^{-2}	104.0	100.0	100.0	96.4	9.08
	3.13×10^{-3}	104.0	100.0	100.0	98.2	9.06
	7.81×10^{-4}	100.0	100.0	100.0	100.0	9.06

It is clear from the table that the activity of trypsin is completely unaffected by these salts, except in the case of aluminium chloride, which was found to accelerate the action of trypsin to some extent.

3. *Effect of manganese, iron, cobalt and nickel salts on the tryptic activity.* The effect of the addition of MnSO_4 , FeSO_4 , FeCl_3 , CoSO_4 and NiSO_4 was then examined in exactly the same manner as described in the foregoing section. In Table II are given the relative effects of Mn, Fe, Co and Ni salts. In Fig. 2 are summarized the effects of these salts after 40 minutes of digestion. The ordinate in the figure denotes the activation or inhibition of the tryptic activity in comparison with the control experiment without salts and the abscissa represents the log molar concentration of salts in the reaction mixture. The effect of aluminium chloride is also given in the figure.

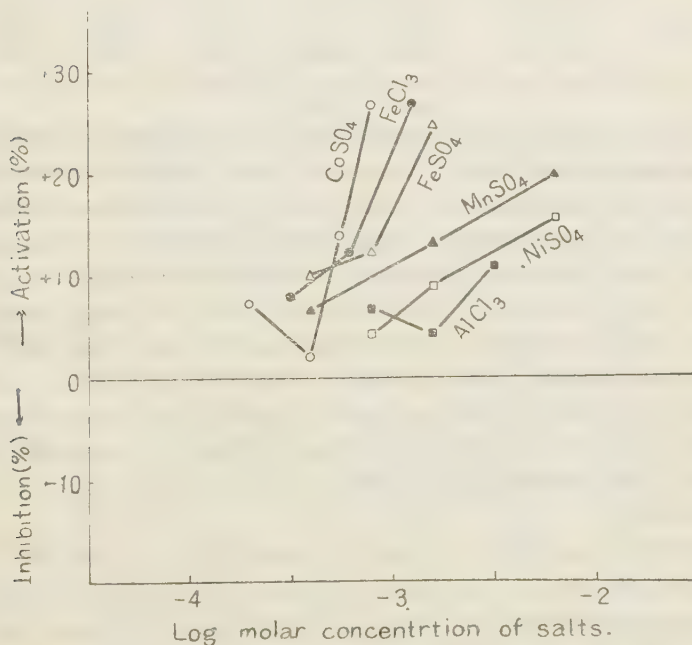


Fig. 2.

TABLE II.

Influence of Mn, Fe, Co and Ni salts on the tryptic activity.

(control = 100)

Salts	Concentrations of salt added (mol)	Time in minutes				pH
		10	20	40	80	
MnSO ₄	6.25×10^{-3}	109.1	118.2	120.0	115.6	9.12
	1.56×10^{-3}	104.5	109.1	113.3	108.8	8.90
	3.91×10^{-4}	100.0	103.0	106.7	101.8	8.96
FeSO ₄	1.56×10^{-3}	150.9	133.3	125.0	123.2	9.16
	7.81×10^{-4}	108.3	105.6	112.5	117.9	8.99
	3.91×10^{-4}	125.0	113.9	110.4	112.5	9.08
FeCl ₃	1.04×10^{-3}	129.0	108.3	127.1	125.0	8.90
	5.21×10^{-4}	112.5	105.6	112.5	117.9	8.98
	2.60×10^{-4}	95.8	105.6	108.3	110.7	8.91
CoSO ₄	7.81×10^{-4}	108.0	120.0	124.4	116.4	8.99
	3.91×10^{-4}	104.0	105.7	102.2	110.9	9.00
	1.95×10^{-4}	100.0	97.1	106.7	103.6	8.94
NiSO ₄	6.25×10^{-3}	118.2	118.2	115.6	114.0	9.04
	1.56×10^{-3}	109.1	109.1	108.9	105.3	8.95
	7.81×10^{-4}	95.5	106.1	104.4	101.8	8.99

It will be seen from the table and the figure that the presence of manganese, iron, cobalt and nickel salts markedly accelerates the action of trypsin, and that the degree of acceleration increases with the salt concentration. Moreover, in the case of iron salts it was found that both ferrous and ferric salts are able to cause the activation of the enzyme to approximately the same extent.

4. *Effect of copper, silver, zinc, mercury and lead salts on the tryptic activity.* In this section, the effect of CuSO₄, CuCl₂, AgNO₃, ZnCl₂, HgCl₂ and lead acetate on the tryptic digestion was examined. Table III shows the relative effect of these salts and in Fig. 3 are summarized the effect of the salts after the lapse of 40 minutes.

Table III and Fig. 3 show us clearly that Cu, Ag, Zn, Hg and Pb salts exert an inhibitory effect on the action of trypsin. An especially striking inhibition at a relatively low concentration was noted in the case of silver nitrate.

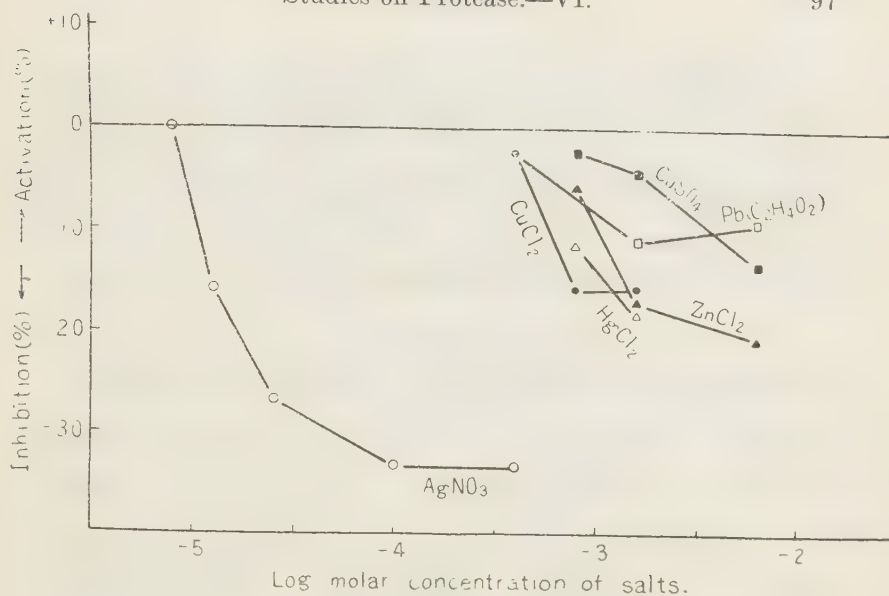


Fig. 3.

TABLE III.

Influence of Cu, Ag, Zn, Hg and Pb salts on the tryptic activity.
(control = 100)

Salts	Concentrations of salt added (mol)	Time in minutes				pH
		10	20	40	80	
CuSO ₄	6.25×10^{-3}	95.7	90.9	86.7	83.3	9.0
	1.56×10^{-3}	100.0	97.0	95.6	88.3	8.93
	7.81×10^{-3}	104.3	100.0	97.8	90.0	9.07
CuCl ₂	1.56×10^{-3}	88.3	74.8	84.4	83.9	9.0
	7.81×10^{-4}	83.3	74.8	84.4	85.7	9.01
	3.91×10^{-4}	95.8	97.0	97.8	92.9	9.08
AgNO ₃	3.91×10^{-4}	68.2	66.7	66.7	61.4	8.91
	9.76×10^{-5}	81.8	66.7	66.7	61.4	8.14
	2.44×10^{-5}	63.6	66.9	73.3	68.4	9.02
	1.22×10^{-5}	68.2	75.8	84.4	87.7	9.05
	6.10×10^{-6}	100.0	97.0	100.0	96.5	8.96
ZnCl ₂	6.25×10^{-3}	81.5	80.0	79.2	85.2	9.0
	1.56×10^{-3}	77.8	77.5	83.1	88.5	8.90
	7.81×10^{-4}	108.0	102.5	94.3	96.7	9.13
HgCl ₂	1.56×10^{-3}	85.0	83.9	81.8	75.5	9.09
	7.81×10^{-4}	95.0	90.3	88.6	84.9	8.91
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	6.25×10^{-3}	84.0	88.6	91.1	92.7	9.0
	1.56×10^{-3}	80.0	85.7	88.9	90.9	9.0
	3.91×10^{-4}	96.0	97.1	97.8	98.2	8.88

5. *Effect of KCN and various complex ion salts on the tryptic activity.* The effects of potassium cyanide, KCN, potassium ferrocyanide, $K_4Fe(CN)_6$, potassium ferricyanide, $K_3Fe(CN)_6$, ferrous ammoniumsulfate, $FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4$, ammonium ferric alum, $NH_4Fe(SO_4)_2$ and sodium nitroprusside, $Na_2[Fe(CN)_5NO]$ on the trypsin are given in Table IV. In Fig. 4 is recorded the influence of these salts after 40 minutes digestion.

TABLE IV.

Influence of KCN and various complex iron salts on the tryptic activity.
(control = 100)

Salts	Concentrations of salt added (mol)	Time in minutes				pH
		10	20	40	80	
KCN	1.25×10^{-2}	60.0	67.7	70.5	77.4	9.27
	3.13×10^{-3}	90.0	90.3	88.6	88.7	9.12
	1.56×10^{-3}	100.0	93.5	88.9	94.3	9.08
	7.81×10^{-4}	100.0	96.8	100.0	101.9	9.03
$K_4Fe(CN)_6$	5.0×10^{-2}	64.5	76.2	79.3	77.1	9.16
	1.25×10^{-2}	71.0	78.6	75.9	77.1	9.14
	3.13×10^{-3}	80.6	90.5	82.8	81.4	9.03
	7.81×10^{-4}	71.0	73.8	82.8	84.3	8.85
	3.91×10^{-4}	77.4	88.1	82.8	94.3	9.18
$K_3Fe(CN)_6$	1.25×10^{-2}	132.0	134.3	128.9	121.8	9.0
	3.13×10^{-3}	132.0	128.6	122.2	116.4	9.0
	7.81×10^{-4}	128.0	128.6	120.0	109.1	8.93
	1.95×10^{-4}	112.0	114.3	111.1	105.5	9.01
$FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4$	3.13×10^{-3}	150.8	140.0	125.0	118.6	8.99
	7.81×10^{-4}	135.7	130.0	116.1	114.3	9.06
	3.91×10^{-4}	117.9	125.0	112.5	110.0	8.98
$NH_4Fe(SO_4)_2$	3.13×10^{-3}	125.0	132.5	121.4	118.6	9.0
	7.81×10^{-4}	107.1	110.0	107.1	107.1	8.9
	3.91×10^{-4}	100.0	102.5	105.4	104.3	8.98
$Na_2[Fe(CN)_5NO]$	3.13×10^{-3}	125.0	117.5	107.3	107.1	9.10
	7.81×10^{-4}	117.9	105.0	105.4	105.7	8.97
	1.95×10^{-4}	107.1	100.0	98.2	100.0	8.91

As is evident from the table and the figure, KCN and $K_4Fe(CN)_6$ retard the action of trypsin, whereas other complex iron salts, such as potassium ferricyanide, ferrous ammonium sul-

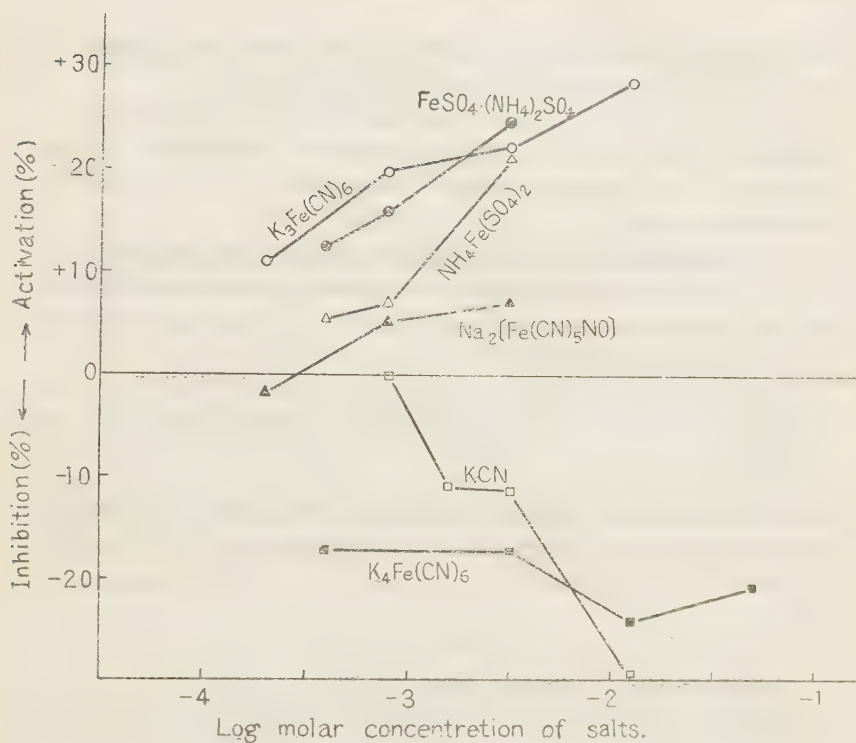


Fig. 4.

fate, ammonium ferric alum and sodium nitroprusside cause the acceleration of the enzyme action.

SUMMARY.

An attempt was made to examine the effects of various inorganic salts on the initial hydrolysis rate of casein by means of trypsin. The experiments were carried out at different pH values of the medium and with the addition of varying amounts of salts.

1. NaCl , KCl , MgCl_2 , CaCl_2 , BaCl_2 , NaNO_3 , Na_2SO_4 and Na_2HPO_4 were found to exert no marked influence on the action of trypsin, whereas AlCl_3 accelerated the tryptic activity to some extent.

2. Manganese, iron, cobalt and nickel salts markedly accere-

late the action of trypsin. Ferrous and ferric salts cause the activation of the enzyme to nearly the same extent.

3. Copper, silver, zinc, mercury and lead salts exert an inhibitory effect on the tryptic digestion. Especially striking retardation was brought about by the silver salt at a relatively low concentration.

4. Potassium cyanide and potassium ferrocyanide inhibit the action of trypsin, while potassium ferricyanide, ferrous ammonium sulfate, ammonium ferric alum and sodium nitroprusside activate the action of the enzyme.

In conclusion the author wishes to express his grateful thanks to Prof. Dr. T. Uchino for his kind direction throughout this investigation.

The expence of this research has been defrayed from the Scientific Research Expenditure of the Department of Education.

T. Uchino.

REFERENCES.

- Clifford (1933): *Biochem. Journ.*, **27**, 326.
Farber and Wynne (1935): *Biochem. Journ.*, **29**, 2323.
Grassmann, Dyckerhoff and Schoenbeck (1929): *Z. für physiol. Chem.*, **186**, 183.
Michaelis and Stern (1931): *Biochem. Z.*, **240**, 192.
Nagai (1922): *Journ. of Biochem.*, **2**, 229.
Nakamura (1940): *Journ. of Biochem.*, **31**, 311.
Uchino (1940): *Journ. of Biochem.*, **31**, 323.
Vonk, Roelofson and Romijn (1933): *Z. für physiol. Chem.*, **218**, 33.

ÜBER DIE VERTEILUNG DES KRYPTOXANTHINS IN PFLANZLICHEN GEWEBEN. I.¹⁾

VON

MASANOBU AJISAKA.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Kitasato-Instituts
zu Tokyo. Direktor: Dr. Akiji Fujita.)

(Eingegangen am 22. April 1942.)

Die Ergebnisse der Bestimmungen über die Verteilung des Kryptoxanthins in pflanzlichen Geweben werden im folgenden berichtet. Die Bestimmungsmethode ist schon von mir in der vorangehenden Arbeit ausführlich beschrieben worden (Ajisaka 1942). Jedesmal habe ich gleichzeitig den Gehalt an Gesamtearotin bestimmt und die relativen Mengenverhältnisse des Kryptoxanthins zu den Carotinen berechnet, um zu erfahren, wie jedes Carotinoid in den betreffenden Geweben an der Vitamin A-Wirkung teilnimmt. Bei einigen Fällen habe ich ausserdem durch Chromatographie an $\text{Ca}(\text{OH})_2$ den Gehalt an α -, β -bzw. γ -Carotin fraktioniert bestimmt. Über die Methodik vergl. Fujita, Narita und Ajisaka 1940. In den Tabellen ist der Prozentgehalt des α -bzw. γ -Carotins vom Gesamtearotin angegeben. Eine nennenswerte Menge γ -Carotin konnte ich bisher nur bei Mohrrüben finden.

Von allen pflanzlichen Geweben, die ich untersucht habe, war Kryptoxanthin am meisten in den Kelchen der reifen Früchte von „Tanbahôzuki“ enthalten und zwar 73 mg%. Kryptoxanthin stellt dabei das hauptsächliche Provitamin A dar. (Vgl. Tabelle I). In Fruchtschale und -fleisch desselben ist aber Kryptoxanthin bedeutend weniger nachweisbar. In unreifen Früchten ist die Kryptoxanthinmenge in den Kelchen sehr gering und die Carotine sind verhältnismässig reichlicher vorhanden und zwar 2 bis 4mal

¹⁾ Der Gesellschaft „Nippon Gakusyutu-Sinkôkai“ danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit, die vorläufig am 22. Oktober 1941 auf dem Biochemischen Kongress zu Kumamoto mitgeteilt wurde (A. Fujita).

TABELLE I.
Früchte.

Datum	Art	Gewebe	Provitamin A- gehalt in mg%		$\frac{\text{Car.}}{\text{Krypt.}}$	Bemerkungen
			Car.	Krypt.		
7. Aug. 1941	<i>Physalis Alkakengi</i> L. var. <i>Francheti</i> Makino (Tanbahôzuki) Reif (rot orange)	{ Verbleibende Kelche Epicarp Meso- u. Endocarp	5,76 0,57 0,12	73,4 4,67 1,08	0,079 0,12 0,11	
6. Aug. 1942	<i>Physalis Alkakengi</i> L. var. <i>Francheti</i> Makino (Tanbahôzuki) Unreif. (grün)	{ Verbleibende Kelche Epicarp Meso- u. Endocarp	1,45 0,40 0,09	0,35 0,11 0,04	4,2 3,6 2,3	15% α 7% α 11% α
10. Okt. 1941	<i>Capsicum annuum</i> L. (Tôgarasi)	Epicarp (trocken)	—	22,9	—	
16. Sept. 1941	<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>grossum</i> Sendt. (Sisifôgarasi)	{ Epicarp { Reif (rot-orange) { Unreif (grün)	0,68 0,60	0,20 0	3,4 —	
3. Okt. 1941	<i>Capsicum annuum</i> L. (Tôgarasi)	Epicarp { Reif (rot) { Unreif (grün)	2,79 1,24	0,17 0	16,4 —	
30. Sept. 1941	<i>Cucurbita moschata</i> Duch. (Kurikabotya)	{ Epicarp Mesocarp Endocarp*	5,84 2,71 8,34	0,80 0,18 0,40	7,3 15,1 20,8	
28. Aug. 1941	<i>Cucurbita Pepo</i> L. ("large pumpkin")	{ Epicarp Mesocarp Endocarp*	0,72 0,25 0,66	0,20 0,06 0,05	3,6 4,2 13,2	

12. Aug. 1941	<i>Cucurbita moschata</i> Duch. var. <i>melonaeformis</i> Makino (Kabotya) Reif (rot braun)	{ Epicarp Mesocarp Endocarp* }	0,10 0,49 11,6	0 0,02 0,10	— 24,5 116	
25. Aug. 1942	<i>Cucurbita moschata</i> Duch. var. <i>melonaeformis</i> Makino (Kabotya) Unreif (grün)	{ Epicarp Mesocarp Endocarp* }	3,10 0,24 5,59	0,12 0,008 0,02	25,8 30,0 280	12% α 46% α 59% α
17. Sept. 1941	<i>Cucumis sativus</i> L. (Kiuri)	Epicarp	1,07	0,05	21,4	
10. Okt. 1941	<i>Trichosanthes cucumeroides</i> Maxim. (Karasuuri) Reif (tiefrot)	Epicarp	22,0	0	—	{ Sehr reich an { Lycopin.
10. Okt. 1941	<i>Trichosanthes cucumeroides</i> Maxim. (Karasuuri) Unreif (grüngelb)	Epicarp	4,07	0	—	
18. Aug. 1941	<i>Trichosanthes cucumeroides</i> Maxim. (Nasiuri)	Epicarp (hellgelb)	0	0	—	
29. Sept. 1941	<i>Castanea pubinervis</i> Schneid. (Kuri)	Cotyledon	0,043	0	—	
14. Aug. 1941	<i>Licopersicon esculentum</i> Mill. (Tomato)	{ Epicarp Meso- u. Endocarp* }	0,84 0,23	0 0	— —	
10. Okt. 1941	<i>Perilla frutescens</i> Brit. var. <i>crispa</i> Decne (Aosiso)	Frucht	3,3	0	—	
27. Apr. 1942	<i>Equisetum arvense</i> L. (Tukusi)	Sporophyllstand	3,87	0,24	16	13% α

* Ausschiesslich Samen.

TABELLE II.
Getreide.

Datum	Art	Gewebe	Provitamin A- gehalt in mg%		$\frac{\text{Car.}}{\text{Krypt.}}$	Bemerkungen
			Car.	Krypt.		
27. Apr. 1942	<i>Zea mays</i> L. (Tómorokosi) Orangerote Art	Korn	0,02	0,18	0,11	
4. Apr. 1942	<i>Zea mays</i> L. (Tómorokosi) Gelbe Art ("long fellow")	"	0,02	0*	—	
19. Mai 1942	<i>Setaria italica</i> Beauv. (Awa) Gelbe Art	"	0,0034	0*	—	
19. Mai 1942	<i>Setaria italica</i> Beauv. (Awa) Hellgelbe Art	"	0,0031	0*	—	

* Am Chromatogramm zeigt sich eine Kryptoxanthinähnliche Zone, die sich aber durch Mischchromatographie als nicht identisch mit Kryptoxanthin erwies.

TABELLE III.
Obst.

Datum	Art	Gewebe	Provitamin A- gehalt in mg%		$\frac{\text{Car.}}{\text{Krypt.}}$	Bemerkungen
			Car.	Krypt.		
3. Dez. 1941	<i>Diospyros Kaki</i> Thunb. (Kaki: "Hyakunegaki")	{ Schale Fruchtfleisch	2,64 0,10	7,24 0,34	0,37 0,29	14% a
24. Nov. 1941	<i>Diospyros Kaki</i> Thunb. (Kaki: "Huyugaki")	{ Schale Fruchtfleisch	2,56 0,11	6,72 0,31	0,38 0,36	17% a 9% a

8. Dez. 1941	Diospyros Kaki Thunb. (Herbe Kaki: "Yamaemon")	{ Schale Fruchtfleisch	1,51	6,20	0,24	16% α
4. Feb. 1942	Citrus Aurantium L. subsp. nobilis var. poonensis Hayata (Ponkan)	{ Schale Fruchtfleisch**	0,05 0,12 0,08	0,40 5,97 0,84	0,13 0,02 0,095	10% α 7% α 4% α
17. Dez. 1941	Citrus delicosa Tenore (Kisyūmikan)	{ Schale Fruchtfleisch**	0,06 0,09	5,62 1,70	0,011 0,053	haupts. β 7% α
12. Dez. 1941	Citrus Unshiu Marcow (Unsyūmikan)	{ Schale Fruchtfleisch**	0,04 0,06	4,10 1,27	0,010 0,047	haupts. β 5% α
20. Apr. 1942	Citrus Aurantium L. subsp. nobilis Makino var. japonica Makino (Kinkan) aus Kagosima	Ganzes	0,07	1,02	0,07	
10. Feb. 1942	Citrus Aurantium L. subsp. amara Engl. var. Kunep Makino ("navel orange")	{ Schale Fruchtfleisch**	0,02 0,017	0,93 0,21	0,022 0,081	haupts. β haupts. β
20. Apr. 1942	Citrus Natsundaikai Hayata (Natūmikan)	{ Schale Fruchtfleisch**	0,002 0,003	0,31 0,09	0,006 0,033	
13. Mai 1941	Citrus sulcata Hort et Tanaka (Sanbōkan)	{ Schale Fruchtfleisch**	— —	0,306 0,045	— —	
16. Apr. 1942	Citrus medica L. subsp. Lemonum Hook fl. ("lemon") aus Kagosima	{ Schale Fruchtfleisch**	0,03 0	0,06 0,03	0,50 —	
22. Dez. 1941	Citrus grandis Osbeck (Buntan) aus Kagosima Rotviolette Art	{ Schale Fruchtfleisch**	0,02 0,08	0 0	— —	
6. Juni 1941	Carica Papaya L. (Papaya)	{ Schale Fruchtfleisch	— —	1,26 1,04	— —	{ 2% α , haupts. Lycopin

Datum	Art	Gewebe	Provitamin A- gehalt in mg%		Car. Krypt.	Bemerkungen
			Car.	Krypt.		
2. Sept. 1941	<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad. (Suika)	{ Epicarp { Grüner T. { Blaigrüner T. { Endocarp* (Roter T.)	1,85 4,16 0,15	0,049 0,099 0	38 42 —	
20. Aug. 1941	<i>Cucumis Melo</i> L. ("melon")	{ Epicarp { Mesocarp { Endocarp*	1,36 0,091 0,95	0,036 0,007 0,009	38 13 105	
7. Juni 1941	<i>Eriobotrya japonica</i> Lindl. (Biwa)	{ Schale { Fruchtfleisch { Schale (Grüngelb)	6,92 0,72 0,11	0,30 0,46 0,012	23 2 9	
18. Aug. 1941	<i>Pyrus Simonii</i> Carr. (Yakunonasi)	Schale	0,13	0,011	12	
17. Sept. 1941	<i>Vitis vinifera</i> L. (Sirobudô)	Schale	0,52	0	—	
8. Sept. 1941	<i>Musa paradisiaca</i> L. var. <i>sapientum</i> O. Kuntze (Banana)	{ Schale { Fruchtfleisch	0,20	0,01	20	
11. Juli 1941	<i>Ananas comosus</i> Merr. ("pine apple")	{ Schale { Fruchtfleisch	0,49	0	—	
8. Aug. 1942	<i>Prunus Cerasus</i> L. (Ôtô)	Fruchtfleisch einschl. Schale	0,55 0,04	0 0	— —	20% a

* Ausschlüsslich Samen.

** Ausschlüsslich Endocarp.

TABELLE IV.
Blätter.

Datum	Art	Gewebe	Provitamin A- gehalt in mg%		$\frac{\text{Car.}}{\text{Krypt.}}$	Bemerkungen
			Car.	Krypt.		
10. Okt. 1941	<i>Perilla frutescens</i> Brit. var. <i>crispa</i> Deene (Siso) Grüne Art	Blatt	13,3	0,39	34	
19. Juli 1941	<i>Perilla frutescens</i> Brit. var. <i>crispa</i> Deene (Siso) Rotgrüne Art	"	11,1	0,20	56	
24. Sept. 1941	<i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat. var. <i>sinense</i> Makino (Kiku)	"	6,4	0,20	32	
3. Okt. 1941	<i>Capsicum annuum</i> L. (Togarasi)	"	7,7	0,18	43	
13. Sept. 1941	<i>Daucus Carota</i> L. var. <i>sativa</i> DC. (Ninjin)	"	11,1	0,17	65	
30. Jan. 1942	<i>Brassica campestris</i> L. var. <i>Komatsuna</i> Matsum. et Nakai (Komatuna)	"	5,3	0,17	31	
26. Jan. 1942	<i>Spinacea oleracea</i> L. (Hörensō)	"	5,2	0,14	37	6% a
23. Aug. 1941	<i>Tetragonia expansa</i> Murr. (Turuna)	"	3,5	0,096	36	
3. Jan. 1942	<i>Raphanus sativa</i> L. var. <i>macropodus</i> Makino (Daikon)	"	3,2	0,090	36	9% a
1. Nov. 1941	<i>Xanthoxylum piperitum</i> DC. (Sansyō)	"	7,0	0,094	75	
28. Aug. 1941	<i>Raphanus sativus</i> L. var. <i>acanthiformis</i> Makino (Natudaikon)	"	3,4	0,083	41	
24. Juli 1942	<i>Helianthus annuus</i> L. (Himawari)	"	7,2	0	—	9% a

TABELLE V.
Wurzeln.

Datum	Art	Gewebe	Provitamin A- gehalt in mg%		Car. Krypt.	Bemerkungen
			Car.	Krypt.		
4. Aug. 1941	<i>Daucus Carota</i> L. var. <i>sativa</i> DC. (Ninjin)	Wurzel { äusser T. (dunkelrot) { inner T. (grünlichgelb) Ganzes	8,41	0,019	44	
12. Jan. 1942	<i>Daucus Carota</i> L. var. <i>sativa</i> DC. (Ninjin)		0,36	0,008	45	
29. Nov. 1941	<i>Ipomoea Batatas</i> Lam. var. <i>edulis</i> Makino (Satumaimo) Rotorange Art		7,43	0,04	186	{ 29% a 2% γ
		Wurzel	5,94	0	—	2% a

TABELLE VI.
Blumen.

Datum	Art	Gewebe	Provitamin A- gehalt in mg%		Car. Krypt.	Bemerkungen
			Car.	Krypt.		
10. Juli 1942	<i>Cucurbita moschata</i> Duch. var. <i>melonaeformis</i> Makino (Kabotya)	männl. Blumenblätter (gelb)	0,81	0,82	0,99	5% a
12. Juli 1942	<i>Helianthus annuus</i> L. (Himawari)	Blumenblätter (gelb)	0,37	0,34	1,1	16% a
24. Nov. 1941	<i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat. var. <i>sinense</i> Makino (Kiku)	Blumenblätter (gelb)	0	0	—	

24. Juli 1942	Rudbeckia laciniata L. var. hortensia Bailey (Hanagasagiku)	Blumenblätter (gelb)	0,36	0	—	5% a
29. Juli 1942	Helianthus decapetalus L. var. multiflorus Hort. (Kohimawari)	Blumenblätter (gelb)	0,28	0	—	18% a
21. Juli 1942	Oenothera Lamarkiana Ser. (Ômatuyoigusa)	Blumenblätter (Citronengelb)	0,06	0	—	
27. Juni 1942	Dahlia pinnata Cav. (Tenzikubotan)	Blumenblätter (gelb)	0	0	—	

TABELLE VII.
Algen und Tees (Trockenpräparate).

Datum	Art	Provitamin A- gehalt in mg%		Car. Krypt.
		Car.	Krypt.	
15. Juli 1941	Porphyra tenera Kjellman (Asakusanori)	21,3	2,35	9,1
24. Juli 1941	Grüner Tee ("Sentya" Nr. 1)	13,5	0,86	15,7
24. Juli 1941	Grüner Tee ("Bantya" Nr. 1)	17,6	0,90	19,5
2. Juli 1941	Grüner Tee ("Gyokuro" Nr. 5)	11,6	0,46	25,3
2. Juli 1941	Grüner Tee ("Mattya" Nr. 2)	12,9	0,86	15,0
30. Juli 1941	Schwarzer Tee	2,09	1,01	2,1

soviel Carotine als Kryptoxanthin. Den nächstgrösste Gehalt an Kryptoxanthin fand ich in den trocknen Schoten von „Tôgarasi“. Aber bei frischen Früchten, besonders den unreifen, war der Gehalt an Carotinoiden bei weitem kleiner. Sehr auffallend ist der Befund an Kürbis („Kabotya“), bei dem die Carotine im Zentralteil besonders reichlich und zwar etwa 100 bis 300mal soviel als Kryptoxanthin enthalten sind. Von Carotinen macht α -Carotin dabei merkwürdigerweise im Gegensatz zu vielen pflanzlichen Geweben etwa die Hälfte des Gesamtcarotins aus. Unter den Getreidekörnern besteht das Provitamin A bei der orangeroten Art des Mais hauptsächlich aus Kryptoxanthin. Bei der gelben Art desselben sowie bei Kolbenhirse („Awa“) war eine kleine Menge Carotine, aber keine Spur Kryptoxanthin nachweisbar (Vgl. Tabelle II).

Unter den Obstarten ist es sehr auffallend, dass fast alle Citronenarten verhältnismässig mehr Kryptoxanthin enthalten als Carotine und zwar 3 bis 100mal soviel und der Gehalt des ersteren in den Schalen viel grösser ist, als in Fruchtfleisch (ausschliesslich Endocarp.) Bei „Biwa“ ist der Kryptoxanthingehalt ziemlich gross und in Schalen und Fruchtfleisch etwa gleichmässig verteilt, während Carotine dabei in den Schalen besonders konzentriert vorkommt, wie ich schon hervorgehoben habe (Ajisaka 1940). Bei den übrigen Obstarten ist der Gehalt an Kryptoxanthin sehr gering. (Vgl. Tabelle III).

Blätter enthalten etwa 30 bis 70mal soviel Carotine wie Kryptoxanthin. Der Gehalt an Kryptoxanthin ist etwa 0,1 bis 0,4 mg%. (Vgl. Tabelle IV).

In den Wurzeln wird Kryptoxanthin sehr wenig gefunden. Bei Mohrrüben ist der Gehalt an Carotinen etwa 40 bis 200 mal grösser als der des Kryptoxanthins (Vgl. Tabelle V).

Von den Blumenblättern, die ich untersucht habe, ist der Gehalt an Kryptoxanthin in Kürbis und Sonnenblume ziemlich gross und zwar ungefähr gleich dem der Carotine. Bei sonstigen gelben Blumenblättern konnte ich Kryptoxanthin kaum nachweisen (Vgl. Tabelle VI).

Bei Algen und Teearten ist neben den Carotinen auch

Kryptoxanthin nachweisbar. Der Gehalt des ersteren ist etwa 10 bis 30mal so gross als der des letzteren. (Vgl. Tabelle VII).

Diese Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Dr. A. Fujita ausgeführt, welchem ich an dieser Stelle bestens danke.

LITERATUR.

Ajisaka (1940): Tokyo IZISINSI, **3188**, 16.

Ajisaka (1942): J. Biochem., **35**, 119.

Fujita, Narita und Ajisaka (1940): Tokyo IZISINSI, **3185**, 9.

ÜBER DIE LEZITHINSPALTENDEN FERMENTE.

VON

SHUNJI NOGUCHI.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 7. Juni 1942.)

Über das lezithinspaltende Ferment, Lezithase, liegt bereits eine grosse Reihe von experimentellen Untersuchungen vor. Im Anschluss an die Arbeit von Akamatsu (1923), der die Phosphorsäureabspaltung aus Lezithin durch Takadiastase bewiesen hat, beobachtete Kay (1926) im Nierenextrakt die Anwesenheit einer schwachen Lezithase, die das Lezithin bei pH 7,4 optimal dephosphoriert. Dieselbe Fermentwirkung wurde von King und Page (1930) und King (1931) im Nieren- und Darmschleimhautextrakt gefunden. Die Dephosphorierung des Lezithins wurde später von Udagawa (1935) untersucht. Die fermentative Fettsäureabspaltung aus Lezithin wurde aber eigentlich früher, den Phosphatasestudien vorangehend, erforscht. Delezenne und Fournieu (1914) und Levene, Rolf und Simms (1924) haben die Lysolezithinbildung aus Eigelb durch Kobragift berichtet. Die Existenz eines solchen Ferments beschränkt sich aber nicht nur auf die Schlangengifte. Belfanti und Arnaudi (1932) und Nikuni (1932) fanden das Ferment auch im Pankreasextrakt und Belfanti und Arnaudi (1934) und Ogawa (1936) haben über die Herstellung dieses Pankreasferments berichtet. Die weitere Fettsäureabspaltung aus dem Lysolezithin wurde von Contardi und Ercoli (1933) zum Versuch aufgenommen. Nach diesen Autoren ist die Lezithase in zwei Gruppen, nämlich A und B, eingeteilt werden. Die Lezithase A liefert aus dem Lezithin je ein Molekül Fettsäure und Lysolezithin, während die Lezithase B aus dem Lysolezithin weiter ein anderes Fettsäuremolekül abspaltet, sie ist aber auch fähig zwei Moleküle Fettsäure aus dem Lezithin selbst abzulösen. Der Verfasser hat unter Leitung von

Prof. Akamatsu die fermentative Fettsäureabspaltung aus Lezithin untersucht und konnte die Trennung des aus dem Lezithin Lysolezithin bildenden Ferments, Lezithase oder Phospholipase A, einerseits und des Lysolezithin abbauenden Ferments, Lezithase oder Phospholipase B, andererseits erreichen. Das letztere Ferment ist auf das Lezithin selbst unwirksam, es liefert aber aus dem Lysolezithin unter Abspaltung eines Fettsäuremoleküls den Glyzerophosphorsäurecholinester, der als Quecksilbersalz isoliert werden konnte. In dieser Mitteilung wird über die Trennung von beiden Fermenten und ihre Eigenschaften berichtet.

Als das Herstellungsverfahren der Phospholipase nach Ogawa (1936) am Schweinepankreas angewandt wurde, konnte Verfasser ein kräftiges Fermentpulver wie aus dem Pferdepankreas nicht gewinnen. Es wurde deshalb die Extraktion mittels Rohrzuckerlösung, die bei uns schon oft z. B. zur Isolierung der Glycinebenzoacylase (Mori, 1939), Histidase (Takeuchi, 1941) u. a. gebräuchlich war, versucht und durch fraktionierende Azetonfällung des Extrakts das Ferment als trockenes Pulver bereitet (Versuch I A). Die Wirksamkeit dieses Ferments wurde durch hämolytische Erscheinung festgestellt, die dann auftritt, wenn die vom Ferment bei 37° angegriffene Lezithinlösung mit dem gleichen Volumen 2% Erythrozytenaufschwemmung gemischt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen wird.

Als das bei P_H 7,0 angestellte Lezithinhydrolysat, um die Zeit bis zum Auftreten der totalen Hämolyse zu messen, mit Erythrozytensuspension gemischt wurde, war ein interessantes Verhältnis bemerkbar, indem nämlich jene gemessenen Zeiten nach den Tierarten verschieden waren (Versuch I B₁). Sie war am längsten bei der Ziege und die Reihenfolge war weiter Ziege > Kaninchen > Hund > Meerschweinchen. Dasselbe Zeitverhältnis wurde auch beobachtet, als das Gemisch der Lezithin- und Erythrozytensuspension bei 37° mit Fermentlösung versetzt und der Auftritt der totalen Hämolyse gemessen wurde (Versuch I B₂).

Um die Ursache dieses merkwürdigen Ergebnisses aufzuklären, wurde Lysolezithin zuerst aus Eigelb mittels Habu-Gifts bereitet und sein hämolytisches Vermögen gegen verschiedene Erythrozyten

geprüft (Versuch 1 C). Über die präparative Herstellung des Lysolezithins mittels Pankreasferments wird später berichtet werden. Die Zeit der totalen Hämolyse durch eine sehr verdünnte Lysolezithinlösung war nicht gleich; sie war bei Kaninchen am längsten. Die Reihenfolge war Kaninchen > Ziege > Hund > Meerschweinchen, sie war also verschieden von dem Fall durch das fermentative einstündige Lezithinhydrolysat. In diesem Hydrolysat war aber ausser dem Lysolezithin noch Ölsäure sowie nicht angegriffenes Lezithin vorhanden. Die Beeinflussbarkeit der Hämolysezeit durch diese beiden Substanzen wurde daher untersucht. Ölsaures Natrium übt wie allbekannt wegen seiner Oberflächenaktivität eine hämolytische Wirkung aus. Die Zeit bis zur totalen Hämolyse war beim Hund am längsten; die Reihenfolge war Hund > Ziege > Kaninchen > Meerschweinchen. Sie weicht wieder ganz von den oben erwähnten Fällen ab. Als Lysolezithin aber mit der äquivalenten Menge Natriumoleat versetzt wurde, äusserte das Gemisch bei Anwesenheit des Lezithins jene Reihenfolge der Hämolysezeit wie beim fermentativen Lezithinhydrolysat, nämlich Ziege > Kaninchen > Hund > Meerschweinchen. Sie war auch wohl ohne Lezithinzusatz bemerkbar, konnte jedoch durch die Hämolyseverzögernde Wirkung des beigemischten Lezithins deutlicher gemacht werden. Das Wesen des variierenden Verhaltens der verschiedenen Erythrozyten gegen Lysolezithin und Ölsäure wissen wir nicht. Mit der Erniedrigung der Oberflächenspannung allein hat es nichts zu tun. Es handelt sich möglicherweise um die physikalische sowie chemische Struktur der Stromata der verschiedenen Tiere. Jedenfalls rührt jene Reihenfolge der Hämolysezeit beim fermentativen Lezithinhydrolysat sicher daher, dass das gebildete Lysolezithin mit Ölsäure und ausserdem mit dem noch nicht gespaltenen Lezithin gemischt worden war. Verfasser hat daher bei den nachherigen Versuchen immer Erythrozyten von 4 Tierarten gebraucht, wobei betreffs der hämolytischen Reihenfolge kein widersprechendes Ergebnis gewonnen wurde.

Bei dem nächsten Versuch über die Hitzebeständigkeit des Pankreasferments stiess Verfasser auf einen unerwarteten Befund.

Als nämlich die Fermentlösung bei pH 7,0 vorher eine halbe Stunde bei 40° , 50° und 60° erwärmt wurde, verspätete sich die Hämolyse durch das Lezithinhydrolysat umsomehr, je höher die Temperatur der vorherigen Erwärmung war (Versuch I D). Die Hämolysezeit verlängerte sich aber bei 70° Erwärmung nicht mehr weiter, sondern wurde dabei sogar verkürzt. Die Verkürzung erreichte das Minimum mit der auf 80° erwärmten Fermentlösung; bei den noch stärker erwärmten Lösungen wurde jedoch eine dementsprechend wieder zunehmende Verzögerung der Hämolyse beobachtet. Aber selbst bei 90° oder 100° Erwärmung verschwand die Fermentwirkung nicht gänzlich. Über die hohe Thermostabilität der Lezithase von Schlangengift haben schon Flexner und Noguchi (1901) und Hughes (1935) berichtet. Die Inaktivierungstemperatur der Pankreaslezithase war nach Belfanti und Arnaudi (1932) 58° – 60° . Ogawa (1936) hat dagegen eine hohe Beständigkeit seiner Fermentlösung gegen Erwärmung angegeben, die aber durch beigemischtes Eiweiß stark beeinträchtigt werden konnte. Das Fermentpräparat von Ogawa war sicher an dem begleitenden Protein ärmer als mein Präparat, was vielleicht der Verwendung der Rohrzuckerlösung zur Fermentextraktion zugeschrieben werden kann. Den Verfasser interessierte nun die Frage, warum die auf 80° erwärmte Fermentlösung noch die fast gleiche Lysolezithinbildung wie die nicht erwärmte Lösung ausüben konnte. Die Ursache liegt darin, dass das einmal fermentativ gebildete Lysolezithin durch ein anderes Ferment, das sich nachher als die Phospholipase B herausgestellt hat, weiter abgebaut wird und dass dieses Ferment bei Erwärmen auf 80° inaktiviert wird. In der Tat konnte durch die Wirkung des Pankreasferments jene hämolytische Wirkung des Lysolezithins aufgehoben werden. Die auf 80° erwärmte Fermentlösung veränderte dagegen das Lysolezithin nicht mehr (Versuch I E).

Mein Fermentpräparat aus Schweinepankreas enthielt also ausser der Phospholipase A ein zweites Ferment, das das Lysolezithin weiter aufzuspalten imstande ist. Dieses Präparat wurde aber, nach Yoshida (1941) auf Di-*p*-nitrophenolphosphat bei pH 3,2, 5,6, 7,0 und 9,0 geprüft, als frei von Phosphodiesterase

bewiesen (Versuch I F). Der Lysolezithinabbau muss also durch Abspalten des Fettsäurerestes stattfinden. Zur präparativen Herstellung des Lysolezithins mittels meines Pankreasferments war darum das vorherige Erwärmen der Fermentlösung zweckmässig. Verfasser hat auf solche Weise das Lysolezithin aus Eigelb hergestellt (Versuch I G). Die Studien über die Phospholipase B wurden dann mit diesem Lysolezithin gemacht.

Zuerst wurde das Vorkommen der Phospholipase B im Kaninchenorganen untersucht. Der Lungenextrakt konnte das Lysolezithin spalten, während Niere, Milz, Darmschleimhaut und Leber-Extrakt darauf unwirksam waren (Versuch II A). Das Ferment im Lungenextrakt konnte weiter durch isoelektrische Fällung des begleitenden Eiweisses teilweise gereinigt werden (Versuch II B₁). Das demfolgende Ammoniumsulfatverfahren ergab, dass das Ferment in Globulinfraktion vorhanden war (Versuch II B₂₋₃). Die Fermentfällung durch Ammoniumsulfat-halbsättigung wurde noch zweimal wiederholt, wodurch die Fermentlösung so endlich lipasefrei gemacht werden konnte (Versuch II B₄). Sie machte das Lysolezithin nach kurzer Einwirkung hämolytisch unwirksam (Versuch II B₄), wurde aber bei Erwärmen ihrer Lösung auf 60° inaktiviert (Versuch II C). Die Phospholipase B sowie ihre auf 60° erwärmte Lösung waren nicht fähig, aus dem Lezithin irgendeine hämolytisch aktive Substanz zu erzeugen (Versuch II D). Die Phospholipase B konnte also frei von der A hergestellt werden.

Das PH-Optimum der Phospholipase B war 6,8 (Versuch II E). Contardi und Ercoli (1933) haben aus Reiskleie die Lezithase B hergestellt, die aber auch aus dem Lezithin Fettsäure abspalten konnte. Die optimale Azidität dieses pflanzlichen Ferments war nach den Autoren 3,3. Es handelt sich hier möglicherweise um Isodynamie des Ferments. Diese pflanzliche Lezithase B könnte aber ein Gemisch von Phospholipase A+B sein.

Das PH-Optimum der nicht erwärmten sowie erwärmten Pankreasphospholipase A wurde dagegen bei PH 10,1 gefunden (Versuch II F₁₋₂). Nach Ogawa (1936) was es PH 9,4, während von Belfanti und Arnaudi (1932) PH 6,8-7,0 als Optimum

angegeben wurde. Mein Ergebnis stimmt also mit dem von Ogawa überein.

Die Spezifität der Phospholipase B wurde dann durch die chemische Untersuchung der Spaltprodukte untersucht. Die gereinigte Fermentlösung war frei von der Phosphodiesterase. Man kann also als die Spaltprodukte des Lysolezithins die gesättigte Fettsäure und den Glycerophosphorsäurecholinester erwarten. Aus 1 g Lysolezithin, das durch gereinigtes Lungenferment bis zum Verschwinden der hämolytischen Wirkung abgebaut wurde, konnten in der Tat 0,19 g Palmitinsäure-Stearinsäuregemisch von Schmelzpunkt 54° und 0,2 g Quecksilber-Glycerophosphorsäurecholinester-chlorhydrat isoliert werden (Versuch II G).

EXPERIMENTELLER TEIL.

Lezithin, Lysolezithin sowie Fermentpulver wurden in physiologischer (0,85%) Kochsalzlösung gelöst und mit 0,4% Natronlauge neutralisiert.

Das Lezithin wurde nach Sueyoshi (1931) aus Eigelb hergestellt.

Die Lysolezithindarstellung mittels Schlangengifts war folgende. 20 Stück Eigelb in 400 ccm $M/15$ Phosphatgemisch (P_H 7,0) wurde mit 0,1 g Habugift und 3 ccm Toluol versetzt und als die Zunahme des hämolytischen Vermögens nicht mehr bemerkbar war, wurde die Hydrolysemischung nach Iwata (1931) weiter behandelt. Die Ausbeute des aus Pyridin umkrystallisierten Lysolezithins war 3 g.

Die P-Bestimmung nach Fiske u. Subbarow und N-Bestimmung nach Kjeldahl.

Analyse des Lysolezithins: $C_{24}H_{50}N_1O_8P_1$ (511)

Berechnet	P=6,07%	N=2,73%
Gefunden	P=5,97%	N=2,65%

Das für die Darstellung gebrauchte Habu-Gift wurde uns von dem Forschungsinstitut für Infektionskrankheiten, Tokyo, überlassen, wofür Verfasser Herrn Prof. Dr. Hosoya zu verbindlichem Dank verpflichtet ist.

Die Versuchsanordnungen, nämlich die Herstellung der Puffer-

lösungen, ihre isotonische Neutralisation, die Prüfung des hämolytischen Vermögens u.s.w. waren dieselben wie bei den Versuchen von Ogawa (1936). Darüber siehe seine Mitteilung. Die Zeit bis zur totalen Hämolyse wurde einfachheitsshalber in Stunden (°), Minuten (') und Sekunden (") bezeichnet, (—) bedeutet schwache oder keine Hämolyse in 24 Stunden.

I. PANKREAS-LEZITHASE.

A) Herstellung.

Frisches, gut gemahlenes Schweinepankreas wurde mit 2 fachem Volumen 10% iger Rohrzuckerlösung über Nacht in dem Eisschrank digeriert und die zentrifugierte klare Fermentlösung mit 1,5 fachem Volumen Azeton vermischt. Die Niederschlag wurde zweimal mit Azeton, dann einmal mit Äther gewaschen. Das Fermentpulver wurde dann in Wasser gelöst und nach Entfernung der unlöslichen Masse wurde die klare Lösung wieder, wie zuvor, mit Azeton gefällt und zu Pulver getrocknet.

B) Aktivität des Ferments.

1) 0,25% Lezithin	1,0 ccm	} PH 7,0
Fermentlösung od. Wasser	2,0 "	
Veronalpuffer	1,0 "	

Nach 1 stündiger Fermentwirkung wurde 1,0 ccm davon mit gleichem Volumen 2% Blutzellenaufschwemmung gemischt und die Zeit bis zur totalen Hämolyse bei Zimmertemperatur gemessen.

Fermentlösung	1%	0,5%	0,25%	0,125%	0,01%	Ohne Ferment
Ziege	5°	20°	(—)	(—)	(—)	(—)
Kaninchen	17'	9°	19°30'	(—)	(—)	(—)
Hund	14'	5°	15°20'	23°	(—)	(—)
Meerschweinchen	4'	30'	1°	3°	5°10'	(—)

2) Lezithin (0,08%)	0,5 ccm	} PH 7,0
1% Fermentlösung	0,5 "	
2% Blutzellenaufschwemmung	1,0 "	

Das Gemisch wurde im Wasserbad von 37°C erwärmt. Die Zeit der Totalhämolysen war wie folgt: Ziege, 15'; Kaninchen, 5'; Hund, 3'; Meerschweinchen, 2'.

*C) Auflösung der verschiedenen Erythrozyten durch
neutrales Lysolezithin; Natriumoleat-
und Lezithinlösung.*

Hämolysierende Flüssigkeit	2 ccm Blutzellenaufschwemmung von			
	Ziege	Kanin- chen	Hund	Meer- schweinchen
2,0 ccm M/50000 Lysolezithin	20'	1°	1' 30"	30"
2,0 ccm M/10000 Ölsaures-Natr.	15'	10'	25'	3'
1,0 ccm M/5000 Lysolezithin 1,0 ccm M/5000 Ölsaures-Natr.	2'	1' 30"	1' 20"	1' 10"
0,5 ccm M/1000 Lysolezithin 0,5 ccm M/1000 Ölsaures-Natr. 0,1 ccm 0,25% Lezithin	2°	4'	2' 10"	46"

*D) Stabilität der Fermentlösung bei verschiedener
Temperatur.*

1% Fermentlösung wurde 30 Minuten bei unter anzugebender Temperatur erhitzt und folgende Versuche wurden angestellt.

1% Lezithin	1,0 ccm
Fermentlösung	1,0 "
Puffer (PH 7,0)	4,0 "

Nach 1 stündiger Fermentwirkung wurde jede Probe mit 2% Blutzellenaufschwemmung gemischt.

Temperatur	Vor Erhitzung	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C	100°C
Ziege	2°32'	4°	(-)	(-)	5°	2°10'	20°	(-)
Kaninchen	23'	50'	3°57'	11°	3°30'	45'	17'	(-)
Hund	10'	18'	1°	3°30'	32'	4'	1°30'	2°16'
Meerschweinchen	2' 30"	4'	47'	3°	18'	2'	1°	2°

*E) Spaltung des Lysolezithins durch das
Pankreasferment.*

0,02% Lysolezithin (ca. $M/2500$)	1,0 ccm	} P_H 7,0
Fermentlösung od. Wasser	2,0 "	
Veronalpuffer	1,0 "	

Nach 1 stündiger Fermentwirkung wurde 1,0 ccm davon mit gleichem Volumen 2% Blutzellenaufschwemmung gemischt.

Fermentlösung	0,5%	0,25%	0,125%	0,066%	Ohne Ferment
Ziege	(—)	1°08'	12'	20''	15''
Kaninchen	(—)	16'	7'	20''	13''
Hund	5°25'	15'	5'	15''	10''
Meerschweinchen	5°23'	13'	4'	10''	10''

Als die 1% Fermentlösung vorher auf 80° 30 Minuten erwärmt worden war, war die Hämolysezeit dieselbe wie bei dem Versuch ohne Fermentzusatz. Das Lysolezithin blieb intakt.

F) Phosphodiesterasewirkung des Pankreaspulvers.

M/1000 Di- <i>p</i> -nitrophenol-	
phosphorsaures Calcium	5,0 ccm
1% Fermentlösung	1,0 "
Puffer	4,0 "
P_H 3,2 Glykokoll-HCl	
P_H 5,6 Essigsäure-Azetat	
P_H 7,0 Phosphatgemische	
P_H 9,0 Glykokoll-NaOH	

Nach 1–24 stündiger Fermentwirkung war freies *p*-Nitrophenol kolorimetrisch bei keinem Ansatz nachweisbar.

G) Lysolezithindarstellung mittels Pankreasferment.

5 g Schweinepankreaslezithase wurden in 500 ccm $M/15$ Phosphatgemisch (P_H 7,0) gelöst, 30 Minuten auf 80°C erhitzt, der entstandene Niederschlag abzentrifugiert, die klare überstehende Flüssigkeit mit geschlagenem Eigelb aus 20 Eiern und 3 ccm Toluol versetzt und bei 37° aufbewahrt. Das weitere Verfahren war

gleich dem mit Schlangengift. Der Schmelzpunkt des umkrystallisierten Lysolezithins war 263°C (korr.). Ausbeute 2 g.

Analyse: $C_{24}H_{50}N_1O_6P_1$ (511)

Berechnet P = 6,07% N = 2,73%

Gefunden P = 5,95% N = 2,70%

II. PHOSPHOLIPASE B.

A) Verbreitung des Lysolezithinspaltenden Ferments.

Kaninchenorgane wurden gemahlen, in 4 fachem Volumen Wasser 2 Stunden digeriert und zentrifugiert. Der Extrakt wurde dann mit 10 facher Menge 0,85% Kochsalzlösung verdünnt und als Fermentlösung gebraucht.

0,02% Lysolezithin	1,0 ccm	} PH 7,0
Fermentlösung	2,0 "	
Puffer	1,0 "	

Nach 1 stündiger Fermentwirkung wurde 1,0 ccm davon mit gleichem Volumen 2% Blutzellenaufschwemmung gemischt.

	Lunge	Niere	Milz	Darm	Leber	Ohne Ferment
Ziege	20"	30"	15"	15"	15"	15"
Kaninchen	9"	13"	13"	13"	13"	13"
Hund	5"	10"	10"	10"	10"	10"
Meerschweinchen	3"	10"	10"	10"	10"	10"

B) Herstellung der Phospholipase B aus der Kaninchenlunge.

1) Klärung des Extrakts.

Gut gemahlene Kaninchenlunge wurde mit 4 fachem Volumen Wasser 2 Stunden digeriert und zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde dann mit Essigsäure auf PH 5,0 angesäuert und nach Abzentrifugieren des Niederschlags neutralisiert. Beim Fermentversuch nach der oben angegebenen Vorschrift musste diese Lösung noch aufs Vielfache mit 0,85% Kochsalzlösung verdünnt werden.

Verdünnung	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	Ohne Ferment
Ziege	(-)	12°	10'	15''	15''
Kaninchen	(-)	5°	5'	13''	13''
Hund	20°	1°30'	2'	10''	10''
Meerschweinchen	15°	50'	1'	10''	10''

2) Fraktionierung mit Ammoniumsulfat.

Zur Reinigung des Ferments wurde der in gleicher Weise bei PH 5,0 geklärte Lungenextrakt weiter mit Ammoniumsulfat halbgesättigt. Die von der Globulinfraktion befreite Lösung wurde dann mit Ammoniumsulfat gesättigt. Man löste die Globulin- bzw. Albuminfraktion in der dem gebrauchten Extrakt gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung, dialysierte sie gegen 0,85%ige Kochsalzlösung bis zum nächsten Tage und filtrierte den dabei entstandenen Niederschlag ab. Jedes neutralisierte Filtrat wurde mit 0,85% Kochsalzlösung verdünnt und nach obiger Vorschrift auf die Lysolezithinspaltung geprüft.

Verdünnung	Globulinfraktion				Albuminfraktion		Ohne Ferment
	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 10	1 : 40	
Ziege	5°	1°	5'	15''	15''	15''	15''
Kaninchen	2°	25'	20''	13''	13''	13''	13''
Hund	35'	7'	10'	10''	10''	10''	10''
Meerschweinchen	10'	8'	10''	10''	10''	10''	10''

3) Lipasewirkung der ersten Globulinfraktion.

Stalagmometrische Bestimmung bei 23°C nach Rona und Michaelis (1911); Wasserwert der Tropfpipette=94 Tropfen.

Gesättigte Tributylinlösung im
M/54 Phosphatgemisch von PH 7,6 10,0 ccm
Fermentlösung : 0,5 "

Tropfenzahl	Fermentlösung		
	Überstehende Lösung bei P _H 5,0	Albumin- fraktion	Globulin- fraktion
Sofort	138	138	138
Nach 30 Min.	103	128	117
Nach 60 Min.	94	122	101

4) Weitere Reinigung der Fermentlösung.

Um die Lipase in der Globulinfraktion zu beseitigen, wurde die Halbsättigung des bei P_H 5,0 geklärten Extrakts mit Ammoniumsulfat dreimal wiederholt und die dritte Globulinfraktion wurde in der dem gebrauchten Extrakt gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung gelöst und gegen 0.85% Kochsalzlösung dialysiert. Die Wirksamkeit dieser Fermentlösung war folgende.

Verdünnung	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40	Ohne Ferment
Ziege	(-)	5°	15'	25''	15''
Kaninchen	(-)	1°	5'	15''	13''
Hund	22°	25'	2'	15''	10''
Meerschweinchen	20°	8'	1'	10''	10''

Die Lipase in der Fermentlösung verschwand bei der dritten Fraktionierung; Tropfenzahl, sofort 138 und nach 60 Minuten auch 138.

C) Unbeständigkeit der Phospholipase B bei Erwärmung.

5 fach verdünnte Fermentlösung wurde 30 Minuten bei unten angegebener Temperatur erhitzt und die folgenden Versuche wurden angestellt.

0,02% Lysolezithin	1,0 cem	} P _H 7,0
Fermentlösung (1:5)	2,0 "	
Puffer	1,0 "	

Temperatur	vor Erhitzung	40°C	50°C	60°C	ohne Ferment
Ziege	(-)	20°	3°	15"	15"
Kaninchen	(-)	20°	2°	13"	13"
Hund	(-)	18°	1°30'	10"	10"
Meerschweinchen	(-)	13°	45'	10"	10"

D) Nichtspaltbarkeit des Lezithins durch Phospholipase B.

1) Ein Gemisch aus 2 ccm Lezithin + 4 ccm Fermentlösung (5 fach verdünnt) + 2 ccm Veronalpuffer (P_H 7,0) wurde nach 1 und 24 stündigem Aufenthalt bei 37° wie üblich auf seine hämolysierende Kraft geprüft, aber keine Arten Erythrozyten konnte dadurch innerhalb 24 Stunden aufgelöst werden.

2) Der Versuch mit der auf 60° erwärmten Phospholipase B-Lösung in gleicher Weise wie Versuch 1) ergab keine Lezithinhydrolyse.

E) P_H-Optimum der Phospholipase B.

0,06% Lyssolezithin	1,0 ccm
Fermentlösung (1:5)	1,0 "
Puffer	4,0 "

Die Hydrolysemischung wurde nach 1 stündiger Fermentwirkung isotonisch neutralisiert und mit Veronalpuffer von P_H 7,0 auf 12,0 ccm aufgefüllt. Hämolyserversuch mit 1,0 ccm davon + 1,0 ccm 2% Blutzellenaufschwemmung.

P _H	3,6	4,9	6,2	6,8	7,0	8,2	8,4
Ziege	15"	1°	15°	24°	24°	5'	1'
Kaninchen	13"	1'	50'	1°40'	1°20'	3'	23"
Hund	10"	17"	43"	1°25'	1°10'	2'	17"
Meerschweinchen	10"	15"	40'	1°05'	50'	20"	10"

F) Das P_H-Optimum der Lyssolezithinbildung.

1) Pankreaspulver.

2% Lezithin	0,5 ccm
2% Fermentlösung	0,5 "
Puffer	5,0 "

Die Hydrolysemischung wurde nach 1 stündiger Fermentwirkung isotonisch neutralisiert und mit Veronalpuffer von PH 7,0 auf 12,0 ccm aufgefüllt. Hämolyseversuch mit 1 ccm davon + 1,0 ccm 2% Blutzellensuspension.

PH	5,0	6,0	6,8	8,4	9,2	9,7	10,1	10,4	11,5
Ziege	(—)	10°	4°24'	50'	22'	12'	11'	45'	3°22'
Kaninchen	2°50'	1°	22'	7°10''	5°40''	3°45''	2°35''	6'	20'
Hund	28'	8'	6°50''	5°30''	4'	2,20''	1,30''	3'	5'
Meerschweinchen	6'	2°20''	1°20''	1'	50''	40''	30''	1'	1°10''

2) Die bei 80°C 30 Minuten erwärmte 2% Fermentlösung (Phospholipase A).

Die Versuche wurden in gleicher Weise wie bei 1) ausgeführt.

PH	5,0	6,0	6,8	8,4	9,2	9,7	10,1	10,4	11,0
Ziege	18°48'	6°18'	3°50'	2°10'	1°32'	25'	20'	5°	6°30'
Kaninchen	5°12'	2°22'	1°20'	8°30''	6'	4'	3'	12'	1°07'
Hund	2°48'	38'	15'	3°30''	3'	2°30''	2'	3'	4'
Meerschweinchen	5'	3'	2°30''	2'	1'	30''	40''	1'	1°50''

G) Die Spaltprodukte des Lyssolezithins.

Man zerrieb 300 g Kaninchenlunge, fügte 1200 ccm Wasser hinzu und digerierte 2 Stunden bei Zimmertemperatur. Nach dem Zentrifugieren wurde die überstehende Flüssigkeit mit Essigsäure auf PH 5,0 angesäuert und das klare Zentrifugat mit dem gleichen Volumen gesättigtem Ammoniumsulfat versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde in 300 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst und nach Entfernung der unlöslichen Masse wurde die klare Lösung mit Ammoniumsulfat halbgesättigt. Das Verfahren wurde noch einmal wiederholt, der Globulinniederschlag in 300 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst und gegen 0,85%ige

Kochsalzlösung über Nacht dialysiert. Diese Fermentlösung wurde mit 1,0 g Lysolezithin in 1000 ccm physiologischer Kochsalzlösung gemischt und, um das P_H des Gemisches auf 6,8 einzustellen, mit ca. 100 ccm $M/7$ $NaHCO_3$ versetzt und nach Toluolzusatz bei $37^\circ C$ stehen gelassen. Nach 3 Tagen verschwand die hämolysierende Kraft des Gemisches. Die Hydrolysenmischung wurde durch Zusatz von $N-HCl$ auf P_H 4,2 angesäuert und ohne Abfiltrieren des geringen Niederschlages unter vermindertem Druck eingengt, die Lösung des Rückstandes in Absolutalkohol dann von den unlöslichen Massen durch Filtrieren befreit, weiter durch Behandlung mit aktiver Kohle geklärt und unter vermindertem Druck nochmals eingedampft. Dieser Rückstand wurde zuerst mit Äther ausgezogen und die zurückgebliebene ätherunlösliche Masse dann in Absolutalkohol gelöst.

Die ätherlösliche Substanz wurde nach Verdampfen des Äthers aus Absolutalkohol umkrystallisiert. Die Krystalle waren schuppig und schmolzen bei $54^\circ C$. Die Ausbeute war 0,19 g. 0,05 g der Substanz im Äther-Alkoholgemisch (2:1) gebrauchte 1,90 ccm alkoholischer $N/10$ KOH zur Neutralisation gegen Phenolphthalein. Das berechnete Molekulargewicht war 265. Nach diesem sowie nach dem Schmelzpunkt wurde die Substanz als das Gemisch von Palmitinsäure und Stearinsäure betrachtet.

Die alkoholische Lösung jener ätherunlöslichen Substanz wurde mit Äther vermischt, der entstandene weissliche Niederschlag in wenig Wasser gelöst und mit gesättigter $HgCl_2$ Lösung versetzt. Nadelförmige Krystalle schieden sich bald aus, die durch Zentrifugieren gesammelt, zweimal mit kaltem Wasser gewaschen und im evakuierten Exsikkator getrocknet wurden. Schmelzpunkt $228^\circ C$ (korr). Ausbeut 0,2 g. Die Substanz war das Quecksilberdoppelsalz des Glycerophosphorsäurecholinesters.

Berechnet als $(C_{55}H_{100}N_1O_6P_1)_2HgCl_2$ M.G. 784:

$N = 3,57\%$, $P = 7,91\%$, $Cl = 9,05\%$, $Hg = 25,58\%$

Analyse:

0,078 g Substanz lieferte 2,78 mg N (Kjeldahl); $N = 3,54\%$

0,6272 g Substanz lieferte 0,04897 mg P (Fiske und Subbarow);

$P = 7,81\%$

0,01568 g Substanz lieferte 1,375 mg Cl (Volhard-Arnold);

Cl = 8,77 %

0,01568 g Substanz lieferte gravimetrisch 38 mg HgS;

Hg = 24,23 %

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Phospholipase A, die das Lezithin zu Lysolezithin spaltet, wurde aus Schweinepankreas hergestellt. Ihr Optimum war P_H 10,1.

2. Phospholipase B, die das Lysolezithin spaltet, aber auf das Lezithin unwirksam ist, wurde aus der Lunge hergestellt. Ihr Optimum war P_H 6,8.

3. Phospholipase B wird bei Erwärmen ihrer Lösung auf 60°C inaktiviert, während das Ferment A bei weitem thermostabil ist.

4. Sowohl Phospholipase A als auch B sind auf einfaches Glyzerid unwirksam.

5. Als die Spaltprodukte des Lysolezithins durch Phospholipase B wurde der Glyzerophosphorsäurecholinester als Quecksilberdoppelsalz und als Palmitinsäure-Stearinsäure-Gemisch isoliert.

6. Durch partielles Hydrolysat des Lezithins wurden die Erythrozyten je nach Tierarten in verschiedener Geschwindigkeit aufgelöst. Die Ursache war darin zu finden, dass das Lysolezithin an sich auf die verschiedenen Blutzellen ein variierendes Vermögen äussert und dass dieses Verhalten weiter durch beigemischte Ölsäure und intakt bleibendes Lezithin noch in verschiedener Weise beeinflussbar ist.

Diese Untersuchungen wurden unter Leitung von Prof. Akamatsu mit der finanziellen Unterstützung ausgeführt, die Herrn Professor Akamatsu zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung vom Unterrichtsministerium zur Verfügung gestellt wurde.

LITERATUR.

Akamatsu, S. (1923): *Biochem. Z.*, **142**, 186.

Belfanti, S. u. Arnaudi, C. (1934): *Ber. d. gesam. Physiol.*, **76**, 737.

Contardi, A. u. Ercoli, A. (1933): *Biochem. Z.*, **261**, 275.

- Delezenne, C. u. Fourneau, B. (1914): Chem. Centralbl., **85**, 52.
Flexner, S. u. Noguchi, H. (1901): J. Exp. Medicine., **6**, 277.
Hughes, A. (1935): Biochem. J., **29**, 439.
Iwata, M. (1931): Bulletin Agr. Chem. Soc. Japan, **7**, 577.
King, E. J. u. Page, J. H. (1930): Z. Physiol. Chem., **191**, 234.
King, E. J. (1931): Biochem. J., **25**, 799.
Kay, H. D. (1926): Biochem. J., **20**, 791.
Levene, P. A., Rolf, J. P. u. Simms, H. S. (1924): J. of Biol. Chem.,
58, 859.
Michaelis, L. (1931): Biochem. Z., **234**, 139.
Mori, H. (1939): J. of Biochem., **29**, 225.
Nikuni, J. (1932): Bull. Agr. Chem. Soc. Japan., **8**, 104.
Ogawa, K. (1936): J. of Biochem., **24**, 389.
Rona, P. u. Michaelis, L. (1911): Biochem. Z., **31**, 345.
Sueyoshi, Y. (1931): J. of Biochem., **13**, 143.
Takeuchi, M. (1941): J. of Biochem., **34**, 23.
Udagawa, H. (1935): J. of Biochem., **22**, 323.
Yoshida, S. (1941): J. of Biochem., **34**, 23.

**BIOCHEMICAL STUDIES ON *d*-RIBOSE,
WITH SPECIAL REFERENCE TO THE MECHANISM
OF ABSORPTION OF SUGARS FROM
INTESTINAL TRACT.**

By

YOSINORI NAITÔ.

*(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical School.
Director: Prof. N. Ariyama.)*

(Received for publication, July 12, 1942.)

The fact that *d*-ribose is one of the important constituents of ribonucleic acid as well as of various co-enzymes, gives this pentose a special, biochemical significance. Our knowledge on the metabolism of this sugar is, however, still very limited, when compared with the brilliant results attained in the chemical study of the sugar. Hamburger (1922) observed that a part of ribose perfused through the frog kidney was retained by the tissue. Raymond and Blanco (1928), and Dickens (1938) found that ribose was not fermented by living yeast. Ribose-5-phosphoric acid was found by Dickens (l.c.) to be fermentable by the Lebedew extract, one molecule of the substrate producing one molecule of ethyl alcohol, carbon dioxide and phosphoric acid respectively along with a substance or substances of unknown nature. The increasing interest on the metabolism of ribose has prompted a further investigation, the results of which will be published in this paper.

EXPERIMENTAL.

I. Synthesis of d-ribose.

d-Ribose employed in the present experiment was synthesized from gluconic acid. In the first stage of the synthesis, calcium gluconate was converted into *d*-arabinose by the Hockett and Hudson method (1934). The yield was 100 gm. of *d*-arabinose from 350 gm. of calcium gluconate dihydrate. *d*-Arabinose melted

at 155–156°C. $[\alpha]_D^{20} - 103.3^\circ$. *d*-Arabinose was then oxidized to arabonate by bromine in the conventional fashion. The yield was 100 gm. of calcium *d*-arabonate from 100 gm. of *d*-arabinose. In the meanwhile, it was found that the addition of 10% more calcium carbonate than the calculated value increased the yield of arabonate. From the next stage on, the operation followed the Steiger method (1936). Arabonate was epimerized to ribonate and the acid was then converted into cadmium salt. It was found advisable to put the salt through a rigorous process of purification so as to perform the following operations more easily and to increase the yield of the products. The yield was 24 gm. of pure cadmium ribonate from 100 gm. of calcium arabonate. Crystalline lactone of ribonic acid was derived from the cadmium salt. The yield was 12 gm. of lactone from 24 gm. of cadmium salt. The lactone was finally reduced to *d*-ribose with sodium amalgam. When the purest sample of lactone was used, ribose crystallized out directly upon inoculation; otherwise the sugar was obtained in a syrupy state. The yield was 12 gm. of the syrupy ribose or 8 gm. of crystalline ribose from 12 gm. of lactone. The crude ribose was purified through *p*-bromophenylhydrazone, and repeatedly recrystallized from alcohol, until the fusing point reached the constant value. The yield was 4–5 gm. of pure *d*-ribose from 12 gm. of the syrupy crude ribose or from 350 gm. of calcium gluconate.

II. *Some physical properties of d-ribose.*

FP=86–88°C. (uncorr.)—Levene and Jacobs (1909): 86–87°C. (corr.); van Ekenstein and Blanksma (1913): 95°C.; Phelps et al. (1934): 87°C. $[\alpha]_D^{18} - 21.4^\circ$ (H₂O, 2.57%, 2 *dm*)—Levene and Jacobs (l.c.): $[\alpha]_D - 19.5^\circ$ (H₂O, 4%); van Ekenstein and Blanksma (l.c.): $[\alpha]_D - 21.5^\circ$; Kuhn et al (1935): $[\alpha]_D^{22} - 22.5^\circ$ (H₂O, 0.9%).

III. *Some chemical properties of d-ribose.*

The reducing power of ribose against the Somogyi reagent (1926) was 90.5% of that of glucose. This value was reached

after 35 minutes' heating; the value after 15 minutes was 85.3%. Levene and Jorpes (1929) stated that the reducing power of ribose against the Hagedorn-Jensen reagent was equivalent to 87.3% of that of glucose. Ribose was more sensitive to alkali than other pentoses. It is revealed in Table I that at 0.5 *n* sodium hydroxide-alkalinity and at 20°C., the reducing power of the 0.5% ribose solution decreased more rapidly than those of *d*-xylose, and of *d*- and *l*-arabinose. The velocity of the conversion of pentoses into furfural was followed, according to the Hoffman method

TABLE I.

Decrease of Reducing Power of Pentoses in Alkaline Medium.

 5 cc. of 1% pentose solution + 5 cc. of *n* NaOH. 20°C.

Determination of reducing power: Somogyi's method.

Time of incubation (hrs.)	Decrease of reducing power (%)			
	<i>d</i> -Ribose	<i>l</i> -Arabinose	<i>d</i> -Arabinose	<i>d</i> -Xylose
3	5.6	4.1	1.8	4.6
6	11.6	8.1	5.4	8.4
9	17.9	10.5	7.0	12.6

TABLE II.

Production of Furfural from Pentoses (Hoffman's method).

Sugar	Production of furfural from 10 mg. of pentose						
		Time of distillation (min.)					
		15	30	60	90	120	180
<i>d</i> -Ribose	mg.	2.93	4.92	6.18	6.30		6.28
	%	45.7	76.9	96.7	98.4		98.0
<i>d</i> -Xylose	mg.		4.21	5.40		5.99	6.36
	%		65.8	84.4		93.6	99.4
<i>d</i> -Arabinose	mg.			2.82		3.78	4.24
	%			44.1		59.1	66.3
<i>l</i> -Arabinose	mg.			2.71		3.76	4.19
	%			42.3		58.7	65.5

(1927), by distilling sugars with 20% hydrochloric acid and by determining furfural colorimetrically with aniline acetate. As shown in Table II, the conversion was most rapid in the case of ribose. The almost quantitative production of furfural was achieved after one and a half hours' distillation, while the conversion by this time was about 90% in xylose, and about 50% in *d*- and *l*-arabinose. Ribose in purine nucleosides and purine nucleotides of the yeast origin was found by Hoffman (l. c.) and Ishikawa (1935) to be also quantitatively determinable by the furfural method, though the rate of the production of furfural was more or less retarded by the presence of purines and phosphoric acid which combined with the sugar. Younburg (1927), and Andrews and Milroy (1933) were unable to carry out the 100% conversion of free and combined ribose into furfural. This may be due to the incomplete formation of furfural from ribose under different condition from that of the Hoffman method.

IV. *Biological properties of d-ribose.*

The minimum quantity of ribose, which caused pentosuria after the intravenous injection to the marginal veins of rabbits starved for 24 hours, was 250 mg. per kilogram of body weight. The oral administration of 2 gm. of ribose per kilogram of body weight by the stomach tube did not yet produce definite pentosuria. The tolerance for other pentoses was much lower than that of ribose; less than 50 mg. per kilogram of body weight in the case of the intravenous injection of *d*-xylose and *d*-arabinose, and less than 0.5 gm. in the case of the oral administration. The excretion of sugars was examined by determining the increase of the non-fermentable reducing power of the total urine which was collected by combining the portion excreted during the experimental period and the portion catheterized from the bladder at the end of the period. The far higher tolerance of ribose suggests the much greater utilization of this sugar than other pentoses in the animal body.

The influence of the intravenous injection and the oral administration of ribose on the blood sugar of rabbits which had been starved for 24 hours was examined. The protocol of an experiment

TABLE III.

Intravenous Injection of *d*-Ribose to Rabbit.

Ribose: 250 mg. per kg.

Rabbit: 2450 gm., ♂.

Time	Reducing substance in blood		
	Total (mg. %)	Fermentable (mg. %)	Non-fermentable (mg. %)
Before	88	82	6
After 10 min.	113	92	21
30 "	123	105	18
1 hr.	130	120	10
2 "	107	98	9
3 "	95	88	7
4 "	90	84	6
5 "	88	83	5
7 "	88	83	5

Extra-excretion of non-fermentable reducing substance in urine during
7 hours: 48 mg. in terms of glucose.

TABLE IV.

Oral Administration of *d*-Ribose to Rabbit.

Ribose: 2.0 gm. per kg.

Rabbit: 2300 gm., ♂.

Time	Reducing substance in blood		
	Total (mg. %)	Fermentable (mg. %)	Non-fermentable (mg. %)
Before	92	88	4
After 10 min.	119	106	13
30 "	125	114	11
1 hr.	136	129	7
2 "	124	119	5
4 "	105	100	5
6 "	96	91	5
8 "	90	86	4

Extra-excretion of non-ferm. red. subst. in urine during 8 hrs.:
5 mg. in terms of glucose.

fairly typical for each case is listed in Table III and IV respectively. The values of the non-fermentable sugar which had been raised by the introduction of ribose, fell to the normal level more rapidly than those of the fermentable sugar which had also increased. The blood sugar was determined by the Hagedorn-Jensen method. Table V and VI indicate that a marked appearance of *d*-arabinose and a moderate increase of the fermentable sugar in the blood were induced by the introduction of a small amount of the sugar, and that the curves of arabinose receded to the original value more quickly than those of the fermentable sugar. The increase of the fermentable sugar caused by injection and administration of *d*-xylose and *l*-arabinose has been repeatedly observed in rabbits and rats by many investigators—Corley (1926, 1928), Blanco (1928), Fishberg (1930), Miller and Lewis (1932 ii), Larson and Sawyer (1936). Sawyer (1940) stated that the administration of *l*-xylose to rats did not produce hyperglucemia.

The absorption of ribose from the intestinal tracts of rats was studied. The procedure was somewhat modified from that describ-

TABLE V.
Intravenous Injection of *d*-Arabinose to Rabbit.

Arabinose: 50 mg. per kg.
Rabbit: 2300 gm., ♂.

Time	Reducing substance in blood		
	Total (mg. %)	Fermentable (mg. %)	Non-fermentable (mg. %)
Before	80	70	10
After 15 min.	104	74	30
30 "	100	77	23
1 hr.	96	86	10
2 "	92	82	10
3 "	79	69	10
4 "	79	69	10

Extra-excretion of non-ferm. red. subst. in urine during 4 hrs.:
37 mg. in terms of glucose.

TABLE VI.
Oral Administration of *d*-Arabinose to Rabbit.

Arabinose: 1 gm. per kg.
Rabbit: 2750 gm., ♂.

Time	Blood			Urine	
	Total reducing substance (mg. %)	Fermentable reducing substance (mg. %)	Non-ferm. reducing substance (mg. %)	Fehling's reaction	Orcin reaction
Before	89	77	12	—	—
After 0.5 hr.	129	108	21	—	—
1 "	128	107	21	—	—
2 "	120	102	18	+	+
3 "	110	95	15	±	±
4 "	92	80	12	±	±
5 "	90	78	12	—	—
6 "	89	77	12	—	—

ed by Cori (1925). Rats, weighing from 100 to 150 gm. after having starved for 48 hours, received 2 cc. of the 25% sugar solutions with the aid of a stomach tube (urethral catheter No. 5). The loss of the sugar adhering to the catheter was 5% of the total sugar on an average taken from 10 control experiments. The amount of the sugar absorbed was calculated from the difference between the quantity of the sugar given and that remaining in the stomach and the entire small intestine. The large intestine was discarded, since the quantity of the sugar, found there, was negligible, and there remained a good quantity of intestinal contents which gave a reducing power corresponding to 5 to 10 mg. in terms of glucose. The reducing substance present in the stomach and the small intestine of fasting rats was 0.80 mg. and 3.78 mg. respectively in terms of glucose on an average taken from five experiments. The absorption of the sugar was determined 1 and 2 hours after the feeding, and the absorption coefficients (C) were calculated by the following formula of Cori:

$$C = \frac{A \times 100}{W \times T}$$

where A represents the quantity of the sugar absorbed, W the weight of the rat, and T the time. The results are summarized in Table VII. Emphasis should be laid upon the fact that ribose was absorbed at a remarkably higher rate in comparison with other pentoses, far exceeding even that of fructose. The relative rates were: Glucose 100, ribose 74, *d*-xylose 29 an hour after feeding

TABLE VII.
Absorption of *d*-Ribose from Intestinal Tract of Rat.

Period of absorption (hr.)	Sugar	Body weight (gm.)	Amount of sugar absorbed (gm.)	Absorption coefficient	Relative rate of absorption (glucose = 100)
1	<i>d</i> -Ribose	136	0.205	0.151	74
		128	0.192	0.150	
		123	0.156	0.127	
		119	0.159	0.134	
		132	0.201	0.153	
	<i>d</i> -Glucose	136	0.265	0.195	100
		102	0.204	0.200	
		127	0.234	0.184	
		114	0.201	0.176	
		135	0.284	0.210	
	<i>d</i> -Xylose	119	0.081	0.068	29
		138	0.063	0.046	
		147	0.079	0.054	
		126	0.062	0.049	
		133	0.084	0.063	
2	<i>d</i> -Ribose	130	0.268	0.103	67
		137	0.315	0.115	
		128	0.316	0.123	
		117	0.253	0.108	
		129	0.310	0.120	
	<i>d</i> -Glucose	122	0.471	0.193	100
		141	0.457	0.162	
		140	0.432	0.154	
		137	0.501	0.183	
		129	0.410	0.159	
	<i>d</i> -Xylose	131	0.068	0.026	15
		111	0.071	0.023	
		103	0.054	0.026	
		126	0.073	0.029	
		108	0.046	0.021	

and 100, 67, 15, after two hours. An inspection of these figures will show that the absorption coefficient of all sugars, especially that of xylose fell markedly in the second hour. Miller and Lewis (1932 i) pointed out that this fall of the xylose absorption was noticeable in Cori's experiment. The deviation from Cori's law was demonstrated more definitely in the case of absorption of sugars from the intestinal loops. As described in detail in Chapter VI, sugars were absorbed, during the initial period (15 minutes or so), from the intestinal loops at higher rates followed by lower and constant rates. Dr. Watanabe of this institute found that the rate of the absorption from the whole digestive system was also higher at the very beginning. This tendency of higher absorption at an early stage, which is always observed at various concentrations of sugar solutions, can be explained neither by the difference between the condition in the Cori's and our experiment nor by the change of the sugar concentration during the absorption. There have been published many reports against Cori's law by London and Polowzowa (1909), Pierce et al. (1928-29), Burget et al. (1932 ii), MacKay and Bergman (1933), Ravdin et al. (1933), Feyder and Piece (1935), Donhoffer (1935), and others.

The high utilization and the rapid absorption of ribose made it desirable to perform further experiment on the possible glycogen formation from this sugar. For this purpose, 1 cc. of the 4.5% sugar solution was subcutaneously injected into femoral muscles of mice which had been starved for 24 hours. After the lapse of 0.5, 1, 2, and 3 hours, the livers were isolated, and the glycogen contents were determined by the method of Good, Kramer and Somogyi (1933). As the control experiments, glucose (5.4%), *d*-xylose and *d*-arabinose (4.5%) were examined under similar conditions. The glycogen content in the liver of a mouse starved for 24 hours was 86 mg.% on an average taken from 10 experiments. It will be seen in Table VIII that the glycogen fraction, which was alkali-stable and capable of producing, upon acid-hydrolysis, some fermentable reducing substance, increased definitely after injecting ribose, though at a lower rate and to a less extent in comparison

with the case of glucose. Xylose also gave rise to the increase of the glycogen fraction, but it was too small to deserve an attention. No sign of the glycogen synthesis was obtained in the case of *d*-arabinose. The possible formation of glycogen from natural pentoses has often been discussed. Neuberg and Wohlgemuth (1902), and Brasch (1907-8) were unable to demonstrate the conversion of pentoses into glycogen. The confirmative views on the glycogen formation had been advanced by Cremer (1893), Salkowski (1901), Thomas et al. (1921), Nitzescu and Benetato (1925), and others, but they were disproved by recent investigations of Magendantz (1932), Miller and Lewis (1932 i), Silverman and Lewis (1933), Blatherwick and his co-workers (1936), Larson and his co-workers (1940), and others. In view of the failure of the conversion of other natural pentoses to glycogen, the positive result which was noticed in the case of ribose is worthy of an attention.

To give to this point a further support, the isolated livers of rabbits were perfused with the physiological saline solution containing ribose, and the glycogen contents of the livers were examined after a period of an hour. Previous to the perfusion, small pieces of the livers were cut off, and their glycogen contents were determined. These values served as the original glycogen contents of the livers. The perfusion was carried out with an apparatus made by the Iwai Co. The sugar concentration of the perfusing fluid was 0.2%. The quantity of the fluid was 60 cc. As the control experiments, glucose and xylose were used under the same condition. Here again, as shown in Table IX, a definite indication was obtained of the increase of the glycogen fraction in the case of ribose, though to a less extent than in the case of glucose. Xylose was incapable of increasing the glycogen fraction.

The third support to the production of glycogen from ribose will be deferred to Chapter VI, where the synthesis of the glycogen-like substance in the intestinal mucosa will be dealt with.

The evidence so far submitted regarding the synthesis of glycogen from ribose is of an indirect nature, as an isolation of the increased glycogen has been hampered by the glycogen already

TABLE IX.

Formation of Glycogen in Rabbit's Liver After Perfusion with Sugar Solutions.

	Weight of liver (gm.)	Liver glycogen (mg. %)		
		Before perfusion	After perfusion	Increase
<i>d</i> -Glucose	75	113	204	91
	63	124	152	28
	40	175	226	51
	61	104	161	57
	50	143	236	93
				Average: 64
<i>d</i> -Ribose	30	113	131	18
	43	105	133	28
	36	131	154	23
	40	120	144	24
	52	107	125	16
				Average: 22
<i>d</i> -Xylose	55	124	117	-7
	50	111	116	5
	47	140	138	-2
	42	105	103	-2
	38	126	125	-1
				Average: -2

present in the tissues. In the absence of any evidence that there is present in animal tissues other polysaccharide than glycogen which produces a fermentable reducing substance upon acid-hydrolysis, the substance in question will be tentatively called the glycogen-like substance. If this substance is really glycogen, an interesting question will be raised as to how pentoses are converted into hexoses. The elucidation of this question lies, however, beyond the scope of the present experiment.

Much discussion has centered around the problem of the utilization of natural pentoses in the animal body, without arriving at any conclusion. It may be that the utilization, if any, would be of a rather insignificant order. The fact that ribose is convertible into the glycogen-like substance indicates the possible utilization of this

pentose in the animal body. Ribose may be metabolized, at least in part, indirectly in the form of glucose which is formed from the glycogen-like substance, but nothing can be said about the direct utilization of the sugar as such.

V. Phosphorylation during the absorption of d-ribose.

The absorption of ribose from the whole gastro-intestinal tract has been described in a preceeding chapter. The re-examination was made with the use of the intestinal loops. The operation of laying the loops is very serious for rats and may profoundly influence the physiological state of the animal, especially of the digestive tract. Nevertheless, this technique was preferred to the oral administration method, with a view to exclude the deep influence of the stomach on the absorption of sugar from the intestinal tract. The preparation of the loops and the experimental condition were as follows. The rat which had been starved for 24 hours was fixed on the back on an operating table, and the abdominal cavity was opened without anaesthesia. Legatures were placed around the small intestine, beginning 10 cm. below the pylorus, and thus one or several loops of 10 or 20 cm. in length were prepared. One cc. of the 4.5% solution of ribose per 10 cm. of the length was injected into the loop. The abdominal cavity was closed, and the animal was placed in a cage. After the lapse of a certain period of absorption, the abdominal cavity was reopened. The loop was isolated, cut open, and the contents were rinsed out thoroughly with a large amount of warm water. The ribose remaining in the intestinal tract was determined by the Somogyi method. It is shown in Table X that ribose and glucose were absorbed from the loops in the same order as in the case of the oral administration (Table VII). Xylose, the absorption of which was examined in control experiments, was absorbed at a far higher rate than from the whole digestive tract. The relative rates of the absorption of sugars were: Glucose 100, ribose 74, xylose 46. According to an information of Dr. Watanabe, the velocity with which sugar passes from the stomach into the intestine is determined by the quantity of sugar remaining in the latter;

TABLE X.

Absorption of Ribose from Intestinal Loop of Rat.

Loop: 10 cm. Sugar solution: 1 cc.

Period of absorption: 45 min.

No. of experiment	<i>d</i> -Ribose		<i>d</i> -Glucose		<i>d</i> -Xylose	
	Amount absorbed (mg.)	Absorption (%)	Amount absorbed (mg.)	Absorption (%)	Amount absorbed (mg.)	Absorption (%)
I	32.5	72.2	52.9	98.0	20.2	44.9
II	30.8	68.4	51.4	95.2	20.1	44.7
III	32.6	72.4	51.5	95.4	18.6	41.3
IV	31.7	70.4	50.6	94.8	20.3	45.1
V	33.5	74.5	52.7	97.6	18.9	42.1
Average	32.6	71.6	51.8	96.2	19.6	46.3
Relative rate of absorption	74		100		48	

as long as sugar is still remaining in the intestine, the emptying of sugar from the stomach is delayed, and thus the sugar which is more slowly absorbed from the intestine leaves the stomach at a lower velocity. This may then explain why the absorption of xylose takes place slower in the whole gastro-intestinal tract than in the intestinal loop which receives the whole quantity of the sugar at one time.

The selective absorption of ribose at a high rate suggested the possibility that the absorption might be followed by phosphorylation, and this was experimentally proved to be the case. The addition of *m*/5000 moniodoacetate to the sugar solution reduced the rate of absorption of ribose to the level of xylose, indicating indirectly the participation of phosphorylation in the absorption of ribose (Table XI). The following experiments were conducted so as to obtain more direct evidence of the phosphorylation of ribose. The intestinal loop of 10 cm. in length received 1 cc. of the solution which contained ribose in a concentration of 4.5% and also a known amount of phosphate (pH 7.0 phosphate buffer containing 4.88 mg. of phosphorus), and the decrease of phosphate was determined by

TABLE XI.

Inhibition of Absorption of Ribose by Monoiodoacetic Acid.

Conditions: same to those in Table X.

Concentration of monoiodoacetate: *m*/5000.

No. of experiment	<i>d</i> -Ribose		<i>d</i> -Glucose		<i>d</i> -Xylose	
	Amount absorbed (mg.)	Absorption (%)	Amount absorbed (mg.)	Absorption (%)	Amount absorbed (mg.)	Absorption (%)
I	14.7	32.7	30.6	56.7	14.7	32.7
II	23.2	51.6	28.5	52.8	19.8	44.0
III	21.7	48.3	30.8	57.0	20.8	46.2
IV	19.9	44.2	30.1	55.7	23.0	51.1
V	16.4	36.4	29.7	55.0	17.9	39.3
Average	19.2	42.6	35.9	55.4	19.2	42.7

the Teorell method (1931) after 30 minutes in the presence and absence of *m*/5000 monoiodoacetate in the solution. As the control experiments, glucose (5.4%) and xylose (4.5%) were treated under the same condition. The inorganic phosphorus content of the empty intestine of 10 cm. in length was 0.21 mg. on an average. Strictly speaking, no accurate statement can be made concerning the phosphorylation in this sort of experiments, since a part of inorganic phosphate can be directly absorbed without being esterified with sugar. However, if the decrease of phosphate is more marked in the presence of ribose than in its absence, and if this difference is neutralized by the addition of monoiodoacetate, it may be asserted that the phosphorylation accompanies the absorption of ribose. It will be noticed in Table XII that this was the case. The absorption of ribose was followed by a definite decrease of inorganic phosphate and this decrease was almost completely inhibited in the presence of monoiodoacetate, while the falling-off of the quantity of phosphate was slight in the experiments with xylose and without sugar. The third evidence for the phosphorylation of ribose was as follows. The acid-soluble organic phosphate of the intestinal mucosa increased in quantity when ribose was absorbed, but there was no increase when the animal was poisoned with monoiodo-

TABLE XII.

Decrease of Inorganic Phosphate During Absorption of Sugars.

No. of experiment	Decrease of phosphate (mg./100 gm. of dry weight of mucosa)							
	Without sugar		Ribose		Glucose		Xylose	
	Without MJA*	With MJA	Without MJA	With MJA	Without MJA	With MJA	Without MJA	With MJA
I	59	65	81	68	96	64	61	68
II	68	54	92	73	89	56	67	60
III	78	59	86	56	85	70	63	64
IV	62	61	94	67	96	76	70	53
V	57	63	78	59	88	62	73	72
Average	64.8	60.4	86.2	64.6	90.8	65.6	66.8	63.4

* MJA = Monoiodoacetate ($m/5000$).

acetate. The protocol of the experiments is listed in Table XIII. Loops of 20 cm. in length were injected with 2 cc. of the 4.5% ribose solution. Monoiodoacetate (12.0 mg. per 100 gm. of body weight) was injected subcutaneously 1 hour before the beginning of the absorption. Control experiments were run with glucose (5.4%) and xylose (4.5%). The absorption of xylose exerted no influence on the organic phosphate content of the mucosa.

VI. *The mechanism of the selective absorption of sugars.*

The study of the so-called selective absorption of sugar from the intestinal tract was initiated by Nagano in 1902, and followed by Cori (1925), who arranged the comparative figures for the absorption velocity of various sugars. The mechanism by which the selective absorption is carried out has aroused a keen interest among biochemists, including Verzář and his pupils. Wilbrandt and Laszt (1933), in Verzář's laboratory, advanced a hypothesis that phosphorylation of sugars might be closely linked with the selective absorption. This hypothesis was based on the experimental finding that the rapid absorption of glucose, galactose, and fructose, was always accompanied by the increase of organic phosphate in the

TABLE XIII.
Organic Phosphate in Intestinal Mucosa.

	No. of experiment	<i>d</i> -Glucose					<i>d</i> -Ribose				
		Body weight of rat (gm.)	Dry weight of mucosa (gm.)	Total P (mg. %)	Inorg. P (mg. %)	Org. P (mg. %)	Body weight of rat (gm.)	Dry weight of mucosa (gm.)	Total P (mg. %)	Inorg. P (mg. %)	Org. P (mg. %)
Without MJA *	I	185	0.1117	631	249	382	111	0.1229	564	244	320
	II	182	0.1092	531	246	285	116	0.1199	509	224	285
	III	113	0.1073	519	184	335	166	0.1049	526	222	304
	IV	135	0.1062	600	216	388	103	0.1035	490	213	277
	Average		0.1086	570	223	347		0.1128	522	226	296
With MJA	I	137	0.1108	457	228	229	106	0.1018	488	237	251
	II	158	0.1022	493	249	245	113	0.1201	479	250	229
	III	178	0.1067	487	251	236	131	0.1123	443	219	220
	IV	143	0.1077	467	234	236	127	0.1023	483	227	250
	Average		0.1069	477	241	236		0.1091	473	235	238

* MJA = Monoiodoacetate

TABLE XIII. Organic Phosphate in Intestinal Mucosa.—(Continued).

	No. of experiment	<i>d</i> -Xylose					Without sugar (control)				
		Body weight of rat (gm.)	Dry weight of mucosa (gm.)	Total P (mg. %)	Inorg. P (mg. %)	Org. P (mg. %)	Body weight of rat (gm.)	Dry weight of mucosa (gm.)	Total P (mg. %)	Inorg. P (mg. %)	Org. P (mg. %)
Without MJA *	I	113	0.1015	478	229	249	120	0.1123	506	234	272
	II	101	0.1098	493	255	238	148	0.1271	508	277	231
	III	123	0.1099	500	236	264	135	0.1236	486	248	238
	IV	120	0.1028	502	255	247	123	0.1231	479	243	236
	Average		0.1060	493	244	249		0.1215	495	255	240
With MJA	I	135	0.1016	509	229	280	141	0.1401	457	207	250
	II	131	0.1053	509	265	244	169	0.1293	432	214	218
	III	137	0.1023	444	239	205	121	0.1017	488	255	233
	IV	162	0.1074	419	187	232	137	0.1201	469	239	230
	Average		0.1042	470	230	240		0.1228	462	229	233

* MJA = Monoiodoacetate.

intestinal mucosa, while other sugars which did not show the selective absorption were not attended by the esterification of inorganic phosphate. Another evidence for this hypothesis was the fact that the abolition of the selective absorption by moniodoacetate and phlorhizin was followed by the simultaneous interruption of the phosphorylation. The concept of Verzá's school has received an extensive re-examination, without being fully substantiated. The principal point against Verzá's theory is that phosphorylation is not always accompanied by the selective absorption in a strictly quantitative sense: The absorption of fructose takes place rather slowly while its phosphorylation is most striking, and the complete inhibition of the selective absorption by moniodoacetate does not necessarily bring about the complete disappearance of phosphorylation. The question about the validity of Verzá's concept has since become stronger, and Verzá was forced at last to doubt his own view—Verzá and Süllmann (1938). A consideration will be given here to the reason why Verzá's hypothesis is not acceptable as it stands. It is an unequivocal fact that phosphorylation takes place during the selective absorption. However, Verzá's hypothesis has its weakness in his assumption that phosphorylation might be the direct cause of the selective absorption. In the first place, in view of the only momentary existence of the ester, the quantity of organic phosphate does not always indicate the magnitude of phosphorylation. Granting that phosphorylation participates directly in the selective absorption, it is easy to understand why there is a lack of quantitative correspondence between the velocity of the absorption of sugar and the quantity of organic phosphate in the intestinal mucosa at a given time. In the second place, phosphorylation is known to be essential for the following reactions: The synthesis of glycogen from hexoses, phosphorolysis of glycogen, the breakdown of hexoses to lactic acid, and the interconversion between hexoses. It has never been proved, however, that phosphorylation of sugars is also necessary for the absorption which may not require any deep-seated change of sugar molecules. Wilbrandt and Laszt (l.c.) tried to explain the significance of phosphorylation for the absorption by assuming that the diffusion

gradient of sugar, which would be caused, inside and outside the mucosa, by phosphorylation of the absorbed sugar in the mucosa, might accelerate the absorption. A possibility of this sort cannot be overlooked but this is a tentative explanation for which no experimental support has been given. In the absence of extensive glycolysis in the intestinal mucosa, it occurred to the writer that phosphorylation might be involved in the synthesis of glycogen in the mucosa during the selective absorption of sugars. As a matter of fact, it was found that a part of galactose, glucose, ribose, and fructose, which were absorbed selectively, deposited transiently in the intestinal mucosa in the form of the glycogen-like substance while sugars which showed no selective absorption did not contribute to the increase of the glycogen-fraction of the mucosa.

Before entering upon the detailed description of the results of the present experiment, a reference will be made to the literature on the formation of glycogen in the intestinal mucosa, and on the conversion of other sugars into glucose. Polimanti (1914), Lang (1928), and Stuber (1931) postulated the hypothesis that glycogen might be synthesized in the intestinal mucosa from the absorbed glucose. This view was based on the finding that the portal blood of dogs contained more glycogen after than before the absorption of glucose. London and Entin (1934) found that the glycogen content of the arterial blood of dogs increased after the absorption of glucose, and they supported the above-mentioned hypothesis. However, it seems to the writer that this view is not convincing enough, because of such an indirect experimental finding as the rise in glycogen value of the blood, and furthermore, as pointed out by Long and White (1938), because of the fact that the rise was not sufficiently striking. Charit (1927) was unable to notice any increase of blood glycogen after the administration of carbohydrates. According to Kotschneff (1934), the rise in glycogen value was more marked in the arterial blood than in the portal blood, indicating the retention of glycogen in the intestinal wall. The direct experimental proof for the formation of glycogen in the intestinal mucosa was given by Junkersdorf and Mischnat (1930), who found that the glycogen content of the intestinal wall

of starved dogs increased after an oral administration of 3 gm. of glucose per kilogram of body weight, having reached to the maximum of 0.144% after 2 hours, with the initial value of 0.039%. In view of the fact that the object of these investigators was in the study of the influence of various kinds of foodstuffs on the glycogen content of animal tissues, they did not observe the close relation between the absorption of sugar and the glycogen formation in the intestinal wall. Horne and Magee (1933) failed to demonstrate the glycogen synthesis in the small intestine of rabbits and cats after the administration of glucose on these animals. Thus, the literature on this problem furnishes no conclusive evidence yet as to the significance of the glycogen formation in the intestinal mucosa during the sugar absorption.

The conversion of fructose to glucose has been frequently pointed out by many investigators, including Goda (1937) who demonstrated that the conversion was connected with the phosphorylation which was in turn coupled with respiration. Bollmann and Mann (1931) observed that hypoglycemia of hepatectomized dogs was recovered by the administration of fructose, but not when the gastro-intestinal tract was removed. They concluded that the action of fructose manifested itself after it had been converted into glucose, and that this conversion took place in the gastro-intestinal tract. Contrary to this view, Griffiths and Waters (1936) claimed that the direct utilization of fructose in hepatectomized dogs was possible. Burget et al. (1932 i) could not find the conversion of fructose into glucose in the chronically closed loop of dog's ileum and in the isolated living segment of rabbit's small intestine. They stated that fructose might be absorbed as such from the intestine. According to an unpublished paper of Laszt, which was cited by Verzár and McDougall (1936), fructose was converted into glucose by the extract of the intestinal mucosa.

Though the conversion of galactose into glucose has been established, the nature of the mechanism of this reaction remains still unknown. It is, however, quite certain that phosphorylation is also involved in the metabolism of galactose. Harden and

Norris (1910) noticed that the fermentation of galactose by adapted yeast was accelerated by the addition of phosphate, and that inorganic phosphate was converted into an organic form. Nilsson (1930) isolated, as a product of the fermentation of galactose, hexosediphosphate which closely resembled the substance formed as a product of the fermentation of glucose. He also found hexosemonophosphate which was different from any of the known monophosphates. Nilsson was of the opinion that galactose was first decomposed into 3-carbon compounds which were subsequently phosphorylated and synthesized to hexosediphosphate. Cattaneo (1933) obtained phosphoglyceric acid among the fermentation-products of galactose. Grant (1935) showed that hexosediphosphate, trehalosemonophosphate, and, in all probability, the Robison ester were produced during the fermentation of galactose. He, however, failed to demonstrate the production of galactosephosphate. Kosterlitz (1937) stated to have isolated galactosephosphate from livers of rabbits assimilating galactose. Whether the phosphorylation takes place before or after the conversion of galactose into glucose remains yet unsolved. The polysaccharide produced during the fermentation of galactose was found by Harding et al. (1934) and Grant (l. c.) to be identical with that derived from glucose.

The present writer performed the absorption experiments with the use of intestinal loops of rats which had been starved for 24 hours. The technique of preparing the loops has been described in Chapter V. For the determination of glycogen, the loops were cut open, spread on a glass plate, and the whole mucosa were carefully scraped off with a deck glass after the adhering moisture had been blotted off with a sheet of filter paper. The glycogen of the mucosa was determined by Pflüger method modified for the micro-determination; the reducing power after acid-hydrolysis of the glycogen-fraction was determined by the Hagedorn-Jensen method.

The averaged value of the glycogen contents in the mucosa of 20 cm. long small intestine of rats which had been starved for 24 hours served as the comparable control value. The wet weight

of this mucosa averaged 0.580 gm. in 24 experiments (maximum 0.619 gm., minimum 0.506 gm.), and the dry weight was 0.1078 gm. (maximum 0.1355 gm., minimum 0.1015 gm.); the ratio between wet and dry weight was 5.38. The dry weight of the mucosa in the main experiments was calculated by dividing the values of the wet weight by this factor. An average taken from 15 experiments showed that the mucosa contained 304.0 mg. of glycogen per 100 gm. of dry weight (maximum 349 mg., minimum 261 mg.). Since the quantity of glycogen in the mucosa of 20 cm. in length was small, it was expressed in mg. per 100 gm. of dry weight of the mucosa. The glycogen content was not affected by a longer period of starvation such as 48 or 72 hours. There was no significant difference in the glycogen contents between the mucosa of the upper jejunum and that of the lower ileum. The mucosa was to be scraped off carefully so as to remove the adhering muscularis and other tissues as completely as possible; otherwise, the glycogen which was precipitated with alcohol from the alkali-digested tissue showed some reducing power before it was hydrolyzed with acid. The protocols of the main experiments are presented in Table XIV which shows the averages of the data in each series. The intestinal loops of 20 cm. in length received 2 cc. of 5.4% and 4.5% solutions of hexoses and pentoses respectively, and the glycogen contents were determined after 15, 45, and 90 minutes. It is shown in the table that the glycogen fractions were definitely increased during the selective absorption of galactose, glucose, ribose, and fructose, and that the fractions remained practically unchanged in the case of the sugars which showed no selective absorption. The decision as to whether this increase was actually due to the formation of glycogen, especially in the case of sugars other than glucose, is an important problem. The isolation and identification of this increased part of glycogen could not be accomplished in the presence of a large quantity of the pre-formed glycogen. This increased part of glycogen showed, however, a great resistance toward the alkali-digestion, and it produced, upon acid-hydrolysis, some reducing substance which was easily fermented by yeast. The fermentability of the acid-hydrolysis

product of the glycogen fraction, which increased during the absorption of ribose and galactose, was 95 and 94% respectively. All of the available findings seem to show that the product might be glycogen, but so far as there is no direct support for this assumption, the product will be, here again, called the glycogen-like substance. Considering the difficulty with which pentose can be converted into hexose, the present writer paid a special caution in performing the experiments with ribose, and in all the experiments which consisted of 25 cases, there was always a definite increase of the glycogen fraction. Further experimental evidence is needed for the identification of the substance under discussion.

It is shown in Table XIV that the quantity of the glycogen-like substance was larger in the sugar which was absorbed at a higher velocity. The quantity was the largest in galactose; then came glucose, ribose, and fructose, in the order named. The formation of this substance was negligible in sugars which showed no selective absorption, such as mannose, xylose and arabinose. The production curve of the substance rose to a maximum at an earlier stage in the sugar which was absorbed more rapidly, and then the curve tended to recede faster to the original value. The maximum was attained after 15 minutes in the case of galactose, and the value was the highest among the sugars under examination. Glucose reached the maximum between 30 and 45 minutes, and ribose between 45 and 60 minutes. The glycogen-like substance increased linearly at a slow velocity during the absorption of fructose.

A remark will be inserted here concerning the hourly rate of absorption of sugars. By plotting the amounts of the sugar absorbed against time, one can constitute figures from the data in Table XIV. Fig. 1 illustrates that the absorption of every sugar from the intestinal loop took place at a higher rate during the initial stage (15 minutes) followed subsequently by a lower and constant rate. Thus here again, as in the case of absorption from the whole digestive tract, the deviation from the Cori law was observed, the law being confirmed only in the later period of absorption.

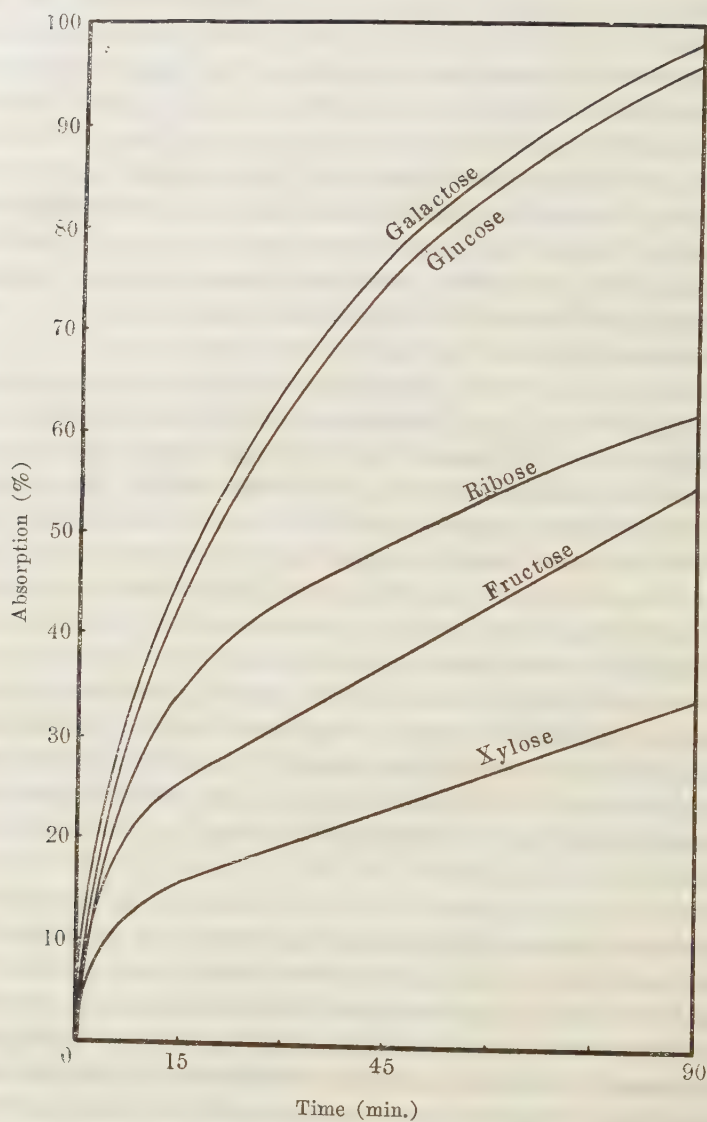


Fig. 1.
Comparative Rates of Absorption of Sugars from
Intestinal Loop.

TABLE XIV.

Formation of Glykogen-Like Substance During Absorption of Sugars.

Period of absorption (min.)	Sugar	Body weight (gm.)	Dry weight of mucosa (gm.)	Glycogen-fraction		Absorption of sugar		Number of experiments
				Found (mg.% ^{*1})	Increased ^{*2} (mg.% ^{*1})	Amount (mg.)	%	
15	Galactose	131	0.1137	732 ^(max. 807 min. 687)	426	50	46	10
	Glucose	130	0.1122	619 ^(max. 678 min. 550)	315	47	43	14
	Ribose	125	0.1091	360 ^(max. 387 min. 347)	56	32	35	10
	Fructose	135	0.1012	312 ^(max. 322 min. 305)	8	28	26	8
	Xylose	118	0.1091	304 ^(max. 366 min. 265)	0	15	16	8
45	Galactose	146	0.1159	648 ^(max. 693 min. 597)	344	83	77	16
	Glucose	124	0.1224	709 ^(max. 799 min. 657)	405	81	75	30
	Ribose	106	0.1136	444 ^(max. 477 min. 418)	140	44	49	20
	Fructose	105	0.1172	354 ^(max. 378 min. 308)	50	42	39	8
	Mannose	131	0.1085	308 ^(max. 395 min. 267)	4	22	21	10
	Xylose	121	0.1023	315 ^(max. 338 min. 291)	11	21	23	10
	<i>d</i> -Arabinose	101	0.1100	308 ^(max. 316 min. 302)	4			
90	Galactose	129	0.1157	417 ^(max. 445 min. 388)	93	106	98	12
	Glucose	144	0.1139	397 ^(max. 411 min. 366)	113	104	96	16
	Ribose	156	0.1020	434 ^(max. 475 min. 379)	130	56	62	8
	Fructose	110	0.1128	395 ^(max. 421 min. 375)	91	59	55	10
	Xylose	135	0.1089	317 ^(max. 329 min. 304)	13	38	34	8

^{*1} Mg. per 100 gm. of dry weight of mucosa.

^{*2} Value found (mg.) - 304 mg. (average content of glycogen in mucosa of animal without receiving sugar).

The increase in the glycogen fraction was strictly restricted to the very part of the mucosa which was brought into contact with sugars. The mucosa close by the ligatures of a loop showed only a very slight increase in the glycogen fraction. This evidence indicated that the increase of the glycogen-like substance was directly connected with sugars which were just absorbed, but not with the general increase of the blood sugar which followed the absorption of sugars. Table XV presents the quantities of the glycogen fractions of 2 series of the 20 cm. long loops; the one received 2 cc. of

TABLE XV.

Restriction of the Glykogen Formation to the Mucosa Absorbing Sugars.

Sugar	No. of experiment	Body weight (gm.)	Part of intest. tract used	Dry weight of mucosa (gm.)	Loop received sugar		Loop received NaCl	
					Glycogen found (mg.%* ₁)	Glycogen increased* ₂ (mg.%* ₁)	Glycogen found (mg.%* ₁)	Glycogen increased* ₂ (mg.%* ₁)
Glucose	I	132	Upper Lower	0.1198 0.1226	593	289	329	25
	II	102	Upper Lower	0.1042 0.1071	507	203	313	7
	III	125	Upper Lower	0.1141 0.1092	552	248	351	47
	IV	118	Upper Lower	0.1251 0.1218	661	357	362	58
	V	110	Upper Lower	0.1090 0.1121	633	326	316	14
	Average				589	285	334	30
Galactose	I	230	Upper Lower	0.1095 0.1088	561	257	305	1
	II	222	Upper Lower	0.1081 0.1081	520	214	309	5
	III	196	Upper Lower	0.1099 0.1091	591	287	337	33
	Average				557	253	317	13

*₁ Mg. per 100 gm. of dry weight of mucosa.*₂ Value found (mg.) - 304 mg. (average content of glycogen in mucosa without receiving sugar).

the 5.4% solution of glucose or galactose, and the other was placed close by the above-mentioned loop either on the upper or the lower part of the small intestine, and received 2 cc. of the 0.9% sodium chloride solution instead of the sugar solution. The period of absorption was 45 minutes. It was found in another experiments

that the glycogen fraction was increased only to a slight extent when the blood sugar was raised by the subcutaneous injection of 2 cc. of the 5.4% glucose solution into rats.

The inhibition of the selective absorption of sugars by poisoning with monoiodoacetate resulted in the simultaneous reduction of the quantity of the glycogen-like substance and of organic phosphate to the level of the sugars which were absorbed without selection. This seems to indicate that the mechanism of the selective absorption, phosphorylation and the formation of the glycogen-like substance are closely linked with each other. The results are summarized in Table XVI. Rats were previously poisoned with monoiodoacetate by subcutaneously injecting 0.12 mg. per gm. of body weight. One hour after this treatment, 2 cc. of the sugar solutions were injected into the intestinal loops of 20 cm. in length, and the glycogen fractions were determined at the end of the

TABLE XVI.

Inhibition of the Formation of the Glykogen-Like Substance and of Phosphorylation by Monoiodoacetate.

	Sugar	Body weight (gm.)	Dry weight of mucose (gm.)	Glycogen fraction		Phosphorus			Number of experiments
				Found (mg.% ^{*2})	Increased ^{*3} (mg.% ^{*2})	Total (mg.% ^{*2})	Inorganic (mg.% ^{*2})	Organic (mg.% ^{*2})	
Without MJA ^{*1}	None	132	0.1211	308	4	495	251	244	4
	Glucose	124	0.1080	655	351	570	223	347	5
	Ribose	116	0.1103	535	231	522	226	296	4
	Xylose	118	0.1098	318	14	493	244	249	4
With MJA ^{*1}	None	142	0.1231	316	12	462	229	233	4
	Glucose	161	0.1054	354	50	477	241	236	4
	Ribose	119	0.1061	341	37	473	235	238	4
	Xylose	134	0.1074	319	15	465	236	229	5

^{*1} Monoiodoacetate.

^{*2} Mg. per 100 gm. of dry weight of mucosa.

^{*3} Values found - 304 mg. (average content of glycogen in mucosa without receiving sugar).

absorption period of 45 minutes.

Though the interrelation between the three reactions mentioned above has not yet been thoroughly elucidated, it appears, by combining the results so far obtained, that the phosphorylation is connected with the selective absorption in the sense that it is involved, at least partly, in the formation of the glycogen-like substance from the absorbed sugars or in the subsequent breakdown of this substance into glucose (or to some fermentable reducing substance). The significance of the formation of the glycogen-like substance is not clear, but it may be interpreted as a precaution to prevent the sudden rise of the blood sugar, by converting a part of the rapidly absorbed sugar into a polysaccharide and fixing it temporarily in the mucosa. That the production curve of the glycogen-like substance attains a maximum followed by recession, means that the substance will be present in the mucosa only for a moment; as soon as it is formed, it may be eliminated into the blood circulation, either as such or as glucose after it has been disintegrated into this monosaccharide.

SUMMARY.

1. *d*-Ribose was most sensitive, among pentoses, to chemical reactions; the sugar was most labile against the action of alkali, and it produced, upon distilling in the presence of mineral acid, furfural at the highest velocity. The yield of furfural was almost quantitative.

2. The minimum quantity of ribose, which caused pentosuria upon the intravenous injection or the oral administration to rabbits, was 250 mg. or 2 gm. per kilogram of body weight respectively.

3. The subcutaneous injection of ribose resulted in the increase of the quantity of the glycogen fraction in the livers of mice. The perfusion of the isolated livers of rabbits with the physiological saline solution containing ribose also raised the glycogen fraction in the livers.

4. Ribose was absorbed from the intestinal tracts of rats which had been starved for 48 hours, at a distinctly higher rate than other pentoses. The relative rate of its absorption in the first hour

was 74 when compared to that of glucose=100.

5. The absorption of ribose from the intestinal loops of rats was also selective. The absorption was followed by the decrease of inorganic phosphate in the intestinal tract and by the increase of acid-soluble organic phosphate in the mucosa. This phosphorylation was inhibited when poisoned with monoiodoacetate.

6. During the absorption from the whole digestive tract, as well as from the intestinal loop, every sugar was eliminated at a distinctly higher rate in the first quarter of an hour, followed by a lower and almost a constant rate. It was pointed out that the Cori law was applicable only in the later period of the absorption.

7. The selective absorption of ribose, glucose, galactose, and fructose, was accompanied by the increase of the glycogen-like substance in the intestinal mucosa of rats. This increase of the substance was more distinct in the sugar which was absorbed at a higher rate. The production curve of the substance rose to a maximum at an earlier stage in the sugar which was absorbed more rapidly, and then the curve tended to recede faster to the original value. The formation of the substance in the mucosa was strictly confined to the very place where the absorption took place. The formation of the substance disappeared when the selective absorption was inhibited by monoiodoacetate. The mechanism of the selective absorption of sugars has been discussed on the basis of these experimental findings, emphasis being given to the close connection between the selective absorption, phosphorylation and the production of the glycogen-like substance.

Expenses of this work were defrayed by Grants for the Advancement of Natural Science from the Department of Education.

REFERENCES.

- Andrews, S. and Milroy, J. A. (1933): *Biochem. J.*, **27**, 1421.
Blanco, J. G. (1928): *J. Biol. Chem.*, **79**, 667.
Blatherwick, N. R., Bradshaw, P. J., Cullimore, O. S., Ewig, M. E., Larson, H. W. and Sawyer, S. D. (1936): *J. Biol. Chem.*, **113**, 405.
Bollmann, J. L. and Mann, F. C. (1931): *Amer. J. Physiol.*, **96**, 683.

- Brasch, W. (1907-8): *Z. Biol.*, **50**, 113.
- Burgett, G. E., Moore, P. and Lloyd, R. (1932 i): *Amer. J. Physiol.*, **101**, 16.
- Burgett, G. E., Moore, P. and Lloyd, R. (1932 ii): *Amer. J. Physiol.*, **101**, 565.
- Cajori, F. A. (1922): *J. Biol. Chem.*, **54**, 617.
- Cattaneo, C. (1933): *Biochem. Z.*, **267**, 456.
- Charit, A. J. (1927): *Pflüger's Arch.*, **214**, 327.
- Cori, C. F. (1925): *J. Biol. Chem.*, **66**, 691.
- Corley, R. C. (1926): *J. Biol. Chem.*, **70**, 521.
- Corley, R. C. (1928): *J. Biol. Chem.*, **76**, 23.
- Cremer, M. (1893): *Z. Biol.*, **29**, 537.
- Dickens, J. (1938): *Biochem. J.*, **32**, 1645.
- Donhoffer, S. (1935): *Pflüger's Arch.*, **235**, 568; *Arch. exper. Path. Pharm.*, **177**, 689.
- Feyder, S. and Pierce, H. B. (1935): *J. Nutrition*, **9**, 435.
- Fishberg, E. H. (1930): *J. Biol. Chem.*, **86**, 665.
- Goda, T. (1937): *Biochem. Z.*, **294**, 259.
- Good, C. A., Kramer, H. and Somogyi, M. (1933): *J. Biol. Chem.*, **100**, 485.
- Grant, G. A. (1935): *Biochem. J.*, **29**, 1661.
- Griffiths, J. P. and Waters, E. T. (1936): *Amer. J. Physiol.*, **117**, 134.
- Hamburger, H. J. (1922): *Biochem. Z.*, **128**, 185.
- Harden, A. and Norris, R. V. (1910): *Proc. Roy. Soc., B*, **82**, 645.
- Harding, V. J., Grant, G. A. and Glaister, D. (1934): *Biochem. J.*, **28**, 257.
- Hockett, R. C. and Hudson, C. S. (1934): *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 1632.
- Hoffman, W. S. (1927): *J. Biol. Chem.*, **73**, 15.
- Horne, E. A. and Magee, H. E. (1933): *J. Physiol.*, **78**, 288.
- Ishikawa, H. (1935): *J. Biochem.*, **22**, 385.
- Junkersdorf, P. and Mischnat, H. (1930): *Pflüger's Arch.*, **224**, 150.
- Kosterlitz, H. W. (1937): *Biochem. J.*, **31**, 2217.
- Kotschneff, N. P. (1934): *Z. exper. Med.*, **94**, 417.
- Lang, K. (1928): *Biochem. Z.*, **200**, 90.
- Larson, H. W., Blatherwick, N. R., Bradshaw, P. J., Ewig, M. E. and Sawyer, S. D. (1940): *J. Biol. Chem.*, **136**, 1.
- Larson, H. W. and Sawyer, S. D. (1936): *J. Biol. Chem.*, **113**, 405.
- Levene, P. A. and Jacobs, W. A. (1909): *Ber. deutsch. chem. Ges.*, **42**, 1198.
- Levene, P. A. and Jorpes, E. (1929): *J. Biol. Chem.*, **81**, 575.
- London, E. S. and Entin, J. B. (1934): *Z. physiol. Chem.*, **225**, 279.
- London, E. S. and Polowzowa, W. W. (1908): *Z. physiol. Chem.*, **57**, 529.

- Long, C. N. H. and White, A. (1938): *Erg. Physiol.*, **40**, 164.
- MacKay, E. M. and Bergman, H. C. (1933): *J. Biol. Chem.*, **101**, 453.
- Magendantz, H. (1932): *Biochem. Z.*, **254**, 170.
- Miller, M. M. and Lewis, H. B. (1932 i): *J. Biol. Chem.*, **98**, 133.
- Miller, M. M. and Lewis, H. B. (1932 ii): *J. Biol. Chem.*, **98**, 141.
- Nagano, J. (1902): *Arch. gesam. Physiol.*, **90**, 389.
- Neuberg, C. and Wohlgemuth, J. (1902): *Z. physiol. Chem.*, **35**, 41.
- Nilsson, R. (1930): *Chem. Zentralbl.*, **I**, 3320.
- Nitzescu, I. I. and Benetato, M. (1925): *C. r. Soc. Biol.*, **102**, 175.
- Phelps, F. P., Isbell, H. S. and Pigman, W. (1934): *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 747.
- Pierce, H. B., Osgood, H. S. and Polansky, J. B. (1928-29): *J. Nutrition*, **I**, 247.
- Polimanti, O. (1914): *Biochem. Z.*, **64**, 490.
- Ravdin, I. S., Johnston, C. G. and Morrison, P. J. (1933): *Amer. J. Physiol.*, **104**, 700.
- Raymond, A. C. and Blanco, J. G. (1928): *J. Biol. Chem.*, **79**, 649.
- Salkowski, E. (1901): *Z. physiol. Chem.*, **32**, 393.
- Sawyer, S. D. (1940): *J. Biol. Chem.*, **136**, 1.
- Silverman, A. K. and Lewis, H. B. (1933): *J. Biol. Chem.*, **101**, 741.
- Somogyi, M. (1926): *J. Biol. Chem.*, **70**, 599.
- Steiger, M. (1936): *Helv. chim. Acta*, **19**, 189.
- Stuber, B. (1931): *Klinische Physiologie*, p. 69.
- Teorell, T. (1931): *Biochem. Z.*, **230**, 1.
- Thomas, P., Gradinescu, A. and Imas, R. (1929): *C. r. Acad. Sci.*, **188**, 664.
- van Ekenstein, W. A. and Blanksma, J. J. (1913): *Chem. Zentralbl.*, **II**, 1562.
- Verzár, F. and McDougall, E. J. (1936): *Absorption from the intestine*, p. 142.
- Verzár, F. and Süllmann, H. (1938): *Biochem. Z.*, **289**, 323.
- Wilbrandt, W. and Laszt, L. (1933): *Biochem. Z.*, **259**, 398.
- Younburg, G. E. (1927): *J. Biol. Chem.*, **73**, 599.

ÜBER DEN BILDUNGSMECHANISMUS DER CHENODESOXYCHOLSÄURE IM ORGANISMUS.

VI. Über das Schicksal der 3.7-Dioxy-12-ketocholansäure sowie der 3.7-Diketocholansäure im Meerschweinchenorganismus.

VON

TUTOMU KANEMITU u. KANZI IWAKI.

(Aus dem Biochemischen Institut Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

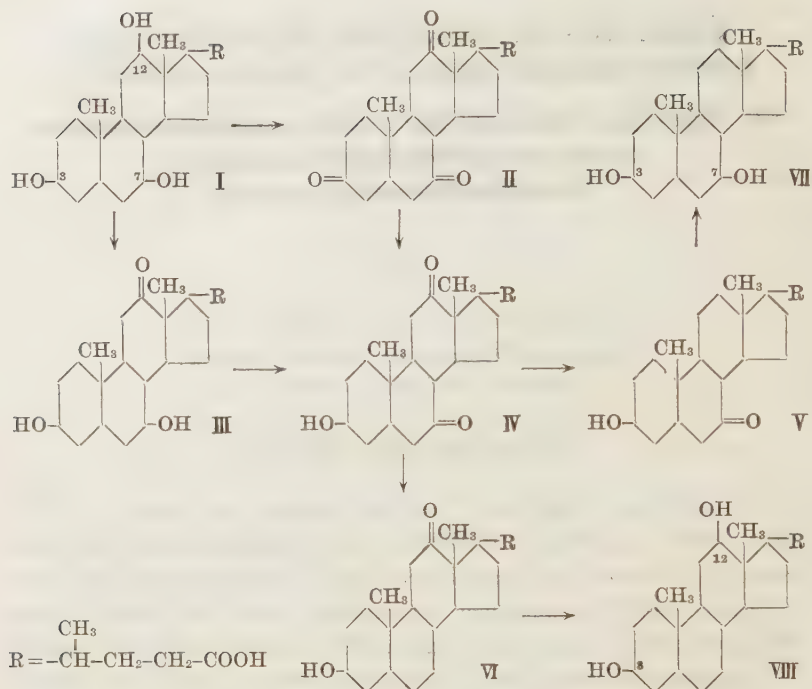
(Eingegangen am 24. Juli 1942.)

Durch eine Reihe von Untersuchungen von Sasaki (1940), Kim (1939) u. Okasaki (1941) wurde wahrscheinlich gemacht, dass die Cholsäure im Organismus erst in Dehydrocholsäure, dann in Reduktodehydrocholsäure verwandelt wird, um weiter durch Oxydoreduktion in Desoxycholsäure übergeführt werden zu können.

Andrerseits wurde von Kataoka (1941 u. 1942) wahrscheinlich gemacht, dass die Bildung der Chenodesoxycholsäure aus Cholsäure entweder über 3.7-Dioxy-12-ketocholansäure oder erst über Dehydrocholsäure, dann weiter über Reduktodehydrocholsäure und über 3-Oxy-7-ketocholansäure vor sich gehen könnte, um weiter in Chenodesoxycholsäure reduziert werden zu können.

Um dies weiter zu bestätigen, wurde den Meerschweinchen 3.7-Dioxy-12-ketocholansäure und Dehydrochenodesoxycholsäure verabreicht und bei ersterem aus dem Harn von Meerschweinchen Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure und bei letzterem Fall aus dem Harn Chenodesoxycholsäure vorgefunden. In der Galle des Meerschweinchens wurde bis heute keine Desoxycholsäure gefunden, so dürfte die aus dem Harn isolierte Desoxycholsäure von der verabreichten 3.7-Dioxy-12-ketocholansäure herkommen.

Die sowohl bei Zufuhr von 3.7-Dioxy-12-ketocholansäure als auch von Dehydrochenodesoxycholsäure aus dem Harn aufgefundene Chenodesoxycholsäure dürfte wohl auch von der ver-



abreichten Dehydrochenodesoxycholsäure oder 3,7-Dioxy-12-ketocholansäure herkommen, da die Chenodesoxycholsäure im Harn ausgeschieden wurde, obwohl sie eigentlich in der Meerschweinchengalle enthalten ist.

Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die eigentliche Chenodesoxycholsäure durch Zufuhr der anderen körperfremden Gallensäuren unter Hydrolyse ausgeschieden worden ist. Bei Zufuhr von Dehydrochenodesoxycholsäure wurde in der Galle eine freie nicht gepaarte 3-Oxy-7-ketocholansäure isoliert, was wohl ein Hinweis sein kann, dass diese 3-Oxy-7-ketosäure aus der verabreichten Dehydrochenodesoxycholsäure gebildet und in der Galle ausgeschieden worden sein dürfte, obwohl die 3-Oxy-7-ketocholansäure immer ein Bestandteil der Meerschweinchengalle ist und in der Galle gewöhnlich gepaart vorkommt. Diese unsere Ergebnisse zeigen wohl, dass die Cholsäure (I) erst in Dehydrocholsäure (II)

oder in 3.7-Dioxy-12-ketocholansäure (III) oxydiert, dann in Reduktodehydrocholsäure (IV) und weiter in 3-Oxy-7-ketocholansäure (V) oder in 3-Oxy-12-ketocholansäure (VI) reduziert wird, um weiter in Chenodesoxycholsäure (VII) oder in Desoxycholsäure (VIII) hydriert zu werden. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass bei Zufuhr der 3.7-Dioxy-12-ketocholansäure im Harn des Meerschweinchens nicht nur Chenodesoxycholsäure sondern auch Desoxycholsäure vorgefunden wurde.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

I. Bei Dehydrochenodesoxycholsäure.

Den Meerschweinchen, die mit Okara und Karotten lange Zeit gefüttert worden waren, wurden jeden Tag 3 ccm einer 1%igen Natriumdehydrochenodesoxycholatlösung in die Bauchhöhle eingespritzt. Die Zahl der für den Versuch gebrauchten Meerschweinchen betrug 107 und die injizierte Dehydrochenodesoxycholsäure belief sich auf insgesamt 25 g.

Nach der Injektion wurde bei den Tieren der Harn durch Katheterisierung gesammelt. Der gesammelte Harn von 107 Meerschweinchen betrug 21 Liter. Der Harn ist schwach alkalisch und hat ein spezifisches Gewicht von 1014–1022. Den gestorbenen und nach der Injektion getöteten Meerschweinchen wurde die Gallenblase sofort herausgenommen und in Alkohol aufbewahrt. Die Gallenblase war praller gespannt und enthielt durchschnittlich je 1,6 ccm Galle.

1. Die Galle.

Die in Alkohol aufbewahrte Galle von 170 ccm wurde abfiltriert, der Alkohol abgedampft und nach dem Ansäuern mit verdünnter Salzsäure mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherauszug wurde in 10%iger Sodalösung aufgenommen und die Sodalösung unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Essigäther ausgeschüttelt. Der Essigätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser und dann nach dem Trocknen abdestilliert. Der Rückstand wurde nach dem Trocknen in Petroläther einige Male digeriert, um die fettige Substanz zu entfernen, und in Äther gelöst.

Von der ätherlöslichen Fraktion wurde der Äther abdestilliert, der Rückstand in Essigäther gelöst und der beim Einengen des Essigätherauszuges abgeschiedene Krystall abfiltriert. Der Krystall wurde erst aus Essigäther, dann aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Tafeln vom Schmelzpunkt 201–202°. Ausbeute 0,11 g.

Der Krystall zeigt bei der Mischprobe mit reiner 3-Oxy-7-ketocholansäure keine Schmelzpunktdepression.

3,500 mg Subst.: 9,452 mg CO₂, 3,005 mg H₂O.

C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ber.	C 73,79%	H 9,81%
	Gef.	" 73,65 "	" 9,77 "

2. Der Harn.

Der Harn wurde mittelst elektrischen Föhns abgedampft, der trockne Rückstand mit heissem absoluten Alkohol fünfmal extrahiert, der Alkoholextrakt (ca. 5 Liter) mit Wasser verdünnt und der Alkohol abgedampft. Die Lösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert, der Ätherauszug mit einer 10%igen Sodalösung extrahiert und in zwei Fraktionen, eine Ätherlösung und eine einen gelatinösen Niederschlag enthaltende Sodalösung, getrennt. Die Sodalösung wurde vom kolloidalen Niederschlag abfiltriert.

Das Filtrat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure wieder ausgeäthert, vom Ätherauszug nach dem Waschen mit Wasser und nach dem Trocknen der Äther abdestilliert, in Petroläther einige Male digeriert, in 5%iger Kalilauge gelöst und auf dem Wasserbade ca. 5 Stunden erhitzt. Das Hydrolysat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert und vom Ätherauszug nach dem Waschen mit Wasser und nach dem Trocknen der Äther abdestilliert. Der Rückstand wurde in 2%iger Ammoniaklösung gelöst, mit einer 5%igen Bariumchloridlösung ausgefällt und filtriert.

Die Bariumsalzfällung wurde in 10%iger Sodalösung gelöst, auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erhitzt und abfiltriert. Das Filtrat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert. Dieser Ätherauszug wurde nach Abdampfen des Äthers wieder in Petroläther digeriert, wieder in Äther aufgenommen, als Bariumsalz gefällt und nach dem Waschen mit Wasser und

Trocknen gewogen. Ausbeute 0,45 g.

Dieses Bariumsalz wurde aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Feine Nadeln. Diese Krystalle wurden in Sodalösung umgekocht und die nach dem Ansäuern erhaltene Fällung aus Essigäther umkrystallisiert. Die Säure schmilzt bei 125–130°. Ausbeute 0,15 g. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Chenodesoxycholsäure. Bei Liebermannscher Reaktion zeigt die Säure eine kirschrote Farbe.

Die durch Oxydation mit Chromsäure und aus Alkohol umkrystallisierte in glänzende Schuppen krystallisierte Dehydrosäure schmilzt bei 152° und zeigt keine Schmelzpunktdepression mit reiner Dehydrochenodesoxycholsäure.

Der in üblicher Weise mit Schwefelsäure-Alkohol bereitete und aus Alkohol umkrystallisierte und in Nadeln krystallisierte Äthylester der Dehydrosäure schmilzt bei 133°.

3,505 mg Subst.: 9,580 mg CO₂, 2,940 mg H₂O.

C ₂₆ H ₄₀ O ₄	Ber.	C 74,95%	H 9,68%
	Gef.	" 74,54 "	" 9,38 "

Das von der Bariumsalzfällung der Chenodesoxycholsäure abgetrennte Filtrat wurde nach dem Ansäuern mit Petroläther und Äther behandelt, aber aus der ätherlöslichen Fraktion kein Krystall gewonnen.

Die aus dem Alkoholextrakt mittelst Sodalösung gewonnenen gelatinösen Niederschläge wurden in 5%iger Salzsäurelösung gelöst, mit Äther ausgezogen, der Ätherauszug nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen abgedampft, von dabei abgeschiedenen Krystallen abfiltriert, nach dem Trocknen in Petroläther digeriert und wieder abfiltriert.

Das Petrolätherfiltrat wurde nach dem Abdampfen aus Alkohol umkrystallisiert. Blättchen vom Schmelzpunkt 65°. Ausbeute 2 g. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Palmitinsäure.

3,520 mg Subst.: 9,622 mg CO₂, 3,935 mg H₂O.

C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Ber.	C 74,94%	H 12,59%
	Gef.	" 75,20 "	" 12,51 "

II. Bei 3.7-Dioxy-12-ketocholansäure.

Den Meerschweinchen wurde 3.7-Dioxy-12-ketocholansäure als

1%ige Natriumsalzlösung jeden Tag in einer Menge von 4 ccm pro kg Körpergewicht 15 Tage lang in die Bauchhöhle eingespritzt. 2 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und ihre Gallenblasen herausgenommen. Die Zahl der zum Versuch verwendeten Tiere betrug 95 und die eingespritzte Gallensäure insgesamt 22,9 g. Die gesammelte Galle betrug 150 ccm und der Harn 21,26 Liter.

1. Die Galle.

Die gelblichbraune klare, schwach alkalische Galle von 150 ccm wurde durch Alkohol von Mucin, dann durch Abdampfen von Alkohol befreit und vor u. nach dem Ansäuern mit verdünnter Salzsäure einige Male ausgeäthert. Die beiden Ätherauszüge wurden mit einer 5%igen Sodalösung ausgeschüttelt, die Sodalösung unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure wieder in Äther aufgenommen und der durch Verdampfen aus dem Ätherauszug erhaltene gelblichweisse Rückstand nach dem Trocknen in Petroläther einige Male digeriert, um das Fett und den Farbstoff zu beseitigen. Dieser Rückstand wurde in 5%iger Kalilauge gelöst, auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erwärmt und filtriert. Das Filtrat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, die gelblichweisse Fällung gut getrocknet, erst in Petroläther einige Male, dann in wasserfreiem Äther digeriert, um den Farbstoff zu entfernen und aus allen möglichen Lösungsmitteln umzukrystallisieren, versucht, aber kein Krystall erhalten. Der Rückstand wurde daher in grösserer Menge von Alkohol mit 0,5 g salzsaurem Semicarbazid und 0,75 g Natriumacetat in 5–6 Tropfen Wasser und in einer kleinen Menge Alkohol versetzt und auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erhitzt. Von der Reaktionslösung wurde der Alkohol abgedampft und diese in eine grössere Menge Wasser eingegossen.

Die dabei abgeschiedene Fällung wurde abfiltriert, getrocknet, in wasserfreiem Äther digeriert und in ätherlösliche und ätherunlösliche Fraktionen getrennt.

Die ätherunlösliche Fraktion wurde nach dem Trocknen in Acetonlösung unter Zusatz einiger Tropfen verdünnter Salzsäure 20 Minuten lang erwärmt, mit viel Wasser verdünnt, auf dem

Wasserbade das Aceton abdestilliert und in Äther aufgenommen. Der Ätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser und nach der Entwässerung abgedampft und der Rückstand in Petroläther und Äther digeriert und in Essigäther gelöst. Aus der Essigätherlösung schieden sich Tafelkrystalle ab, die bei 182–205° schmelzen. Ausbeute 0,13 g. Die Krystalle wurde aus Methanol und Essigäther mehrmals umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzpunkt 218°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner 3.7-Dioxy-12-ketocholansäure.

3,595, 3890 mg Subst.: 9,300, 10,060 mg mg CO₂, 2,900, 3,175 mg H₂O.

C ₂₄ H ₃₈ O ₆	Ber.	C 70,88%	H 9,42%
	Gef.	" 70,55 ", 70,53%	" 9,03 ", 9,13%.

2. Der Harn.

21,26 Liter schwach alkalischen Harns vom spezifischen Gewicht 1012–1018 wurden mittelst elektrischen Föhns abgedampft und getrocknet. Die dabei erhaltene schwarzbraune Masse von 365 g wurde mit absolutem Alkohol extrahiert und zwar fünfmal je 5 Stunden lang. 2,3 Liter Alkoholextrakt wurden eingengt, mit Wasser verdünnt, der Alkohol abgedampft, die dabei erhaltene schwarzbraune Lösung von 300 ccm mit 15 g Kalilauge versetzt und auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erhitzt. Die dabei abgeschiedene schwarzbraune Fällung wurde abfiltriert, mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, die gelbbraune Fällung abfiltriert, gewaschen und die Fällung gut getrocknet. Ausbeute 25 g.

Desoxycholsäure: Die Substanz wurde in Petroläther einige Male digeriert, in wasserfreiem Äther aufgenommen, die Ätherlösung abgedampft, wobei ein brauner Niederschlag gewonnen wurde. Diese Behandlung mit Petroläther und Äther wurde nochmals wiederholt.

Die Ätherlösung wurde nach dem Waschen mit Wasser und nach der Entwässerung abgedampft. Der Rückstand wurde in 2%iger Ammoniaklösung gelöst, mit einer 5%igen Bariumchloridlösung versetzt, die dabei abgeschiedene Bariumsalzfällung mit einer 5%igen Sodalösung 3 Stunden lang umgekocht und filtriert. Das Filtrat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert, die Ätherlösung mit Wasser gewaschen, entwässert

und abgedampft. Der dabei abgeschiedene Krystall wurde aus Eisessig umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 144–145°. Ausbeute 50 mg. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Essig-choleinsäure.

Die Säure wurde in üblicher Weise durch Kochen mit Ameisensäure verestert. Der Ester wurde aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 192–193°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Diformyldeoxycholsäure.

4,245 mg Subst.: 10,890 mg CO₂, 3,390 mg H₂O.

C ₂₀ H ₄₀ O ₆	Ber.	C 69,64%	H 8,93%
	Gef.	" 69,96 "	" 8,93 "

Chenodesoxycholsäure.

Das von Desoxycholsäure befreite ätherische Filtrat wurde abgedampft, mit einer 5%igen KalilaugeLösung versetzt und auf dem Wasserbade 3 Stunden erhitzt. Das Hydrolysat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert, die Ätherlösung mit Wasser gewaschen, entwässert und verdampft. Der Rückstand wurde in Petroläther einige Male digeriert. Der Rückstand wurde in 10 cem einer 2%igen Ammoniaklösung mit einer 5%igen Bariumchloridlösung ausgefällt und die gelbbraune Bariumsalzfällung mit einer 5%igen Sodalösung auf dem Wasserbade 3 Stunden umgekocht und abfiltriert.

Das Filtrat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert. Die aus dieser Ätherlösung erhaltene Substanz wurde zweimal in Bariumsalz verwandelt. Diese Bariumsalzfällung wurde aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Lange Nadeln. Dieses Bariumsalz wurde mit 5%iger Sodalösung umgekocht, dann abfiltriert und das Filtrat mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die gelbweisse Fällung wurde aus Essigäther umzukrystallisieren versucht, aber kein Krystall erhalten. Ausbeute 0,1 g. Es schmilzt bei 110–140°.

Die Substanz wurde in 10 cem reiner Ameisensäurelösung auf dem Wasserbade 6 Stunden lang erwärmt und die Reaktionslösung in eine grosse Menge Wasser eingegossen. Die dabei abgeschiedene Fällung wurde aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzpunkt 182–183°. Ausbeute 20 mg. Keine Schmelzpunkt-

depression mit reiner Diformylchenodesoxycholsäure.

3,640 mg Subst.: 9,275 mg CO₂, 2,795 mg H₂O.

C ₂₆ H ₄₀ O ₆	Ber.	C 69,64%	H 8,93%
	Gef.	" 69,49 "	" 8,59 "

LITERATUR.

- Kataoka, Y. (1943): J. of Bioch., **36**, 55 u. 61.
 Kataoka, Y. (1941): J. of Bioch., **34**, 87, 93 u. 99.
 Kim, C. H. (1939): Z. Physiol. Chem., **261**, 97.
 Okasaki, Y. (1941): J. of Bioch., **33**, 83.
 Sasaki, T. (1940): J. of Bioch., **32**, 84 u. 87.

SYNTHESE DER β -3- α -12-DIOXY-ALLOCHOLANSÄURE UND DER β -3- α -12-DIOXY-CHOLANSÄURE.

VON

KENZI MATUMOTO.

(Aus dem Biochemischen Institut Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 24. Juli 1942.)

Die bisher bekannten Gallensäuren sind Abkömmlinge der Cholansäure, die als Stammsäure betrachtet wird. Wie allgemein bekannt ist, ist die biologische Wirksamkeit des einzelnen Gallensäure-Präparates von seiner chemischen Konfiguration stark abhängig.

Um die Gallensäure in ein Sexuallhormon überzuführen wurde zuerst die Synthese der Allodesoxycholsäure vorgenommen. Aus Diacetyldeoxycholsäuremethylester wurde nach dem Verfahren von K. Yamasaki und K. Kyogoku (1935) 3-Keto-12-acetoxycholansäure vom Schmelzpt. 169° hergestellt und in Eisessiglösung bromiert, wobei unter Aufnahme eines Atoms Brom eine Säure von der Formel $C_{26}H_{39}O_5Br$ (I) und vom Schmelzpt. 141° erhalten wurde. Das Bromatom tritt in der Stellung an C_4 ein, wie T. Noguchi (1931) bei der Bromierung der Dehydrocholsäure beobachtet hat.

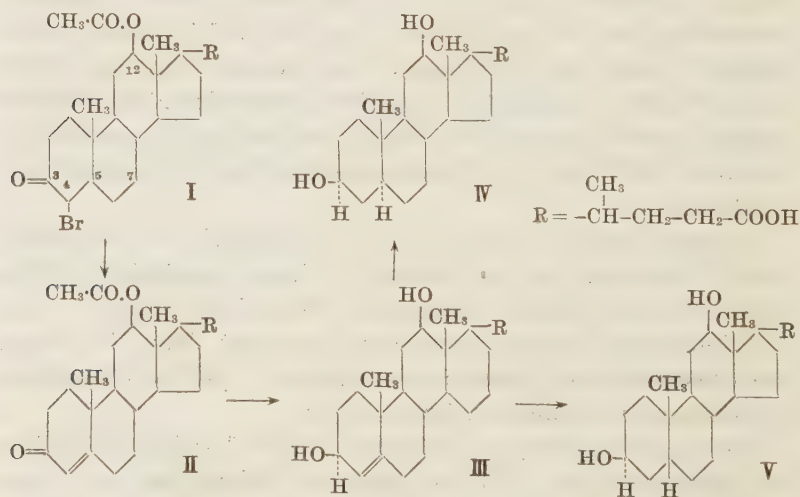
Dieses Monobromketon wurde in wasserfreier Pyridinlösung durch Erwärmung bis zum Sieden zu einem ungesättigten Keton von der Formel $C_{24}H_{36}O_4$ entbromt, welches bei 240° schmilzt. Aus Δ^4 -3-Keto-12-acetoxycholensäure vom Schmelzpt. 160° (II) wurde durch Reduktion mit Aluminiumisopropylat Δ^4 - β -3-Oxy-12-acetoxycholensäure vom Schmelzpt. 186° erhalten.

Die nach Hydrolyse erhaltene Δ^4 - β -3- α -12-Dioxycholensäure vom Schmelzpt. 201° (III) ist durch die Behandlung mit Essigsäureanhydrid oder mit konz. Alkalilösung in Δ^5 - β -3- α -12-Dioxycholensäure vom Schmelzpt. 161° übergegangen, wie das Allocholesterin dadurch in Cholesterin umgelagert wurde (Windaus

1927).

Δ^4 - β -3- α -12-Dioxycholensäure wurde in neutralem Medium durch Hydrierung mit Platinoxid nach Adams und Wasserstoff in kleinerer Ausbeute in β -3- α -12-Dioxyallocholensäure (IV), β -Allodesoxycholsäure von der Formel $C_{24}H_{30}O_4$ und vom Schmelzpt. 230° und $[\alpha]_D = +37,87^\circ$ übergeführt, aus welcher durch weitere Oxydoreduktion Allocholensäure vom Schmelzpt. 168° erhalten wurde. Der Methylester der neuen Säure schmolz bei 140° . In grösserer Menge wurde dabei aber β -3- α -12-Dioxycholensäure vom Schmelzpt. 178° und $[\alpha]_D = +37,80$ (V) gewonnen, die auch durch Hydrierung mit Platinoxid und Wasserstoff in saurem Medium aus Dehydrodesoxycholsäure vom Schmelzpt. 188° gewonnen wurde. Der Methylester der Säure schmolz bei 155 – 156° . β -3- α -12-Dioxycholensäuremethylester ist in Alkohol durch eine alkoholische Digintoninlösung fällbar.

Die beiden neuen Säuren, β -3- α -12-Dioxycholensäure u. β -3- α -12-Dioxy-allocholensäure bilden aber mit anderen Substanzen keine Choleinsäure.



BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

I. 3-Keto-12-acetoxycholansäure.

Diacetyl-desoxycholsäure-methylester.

50 g Desoxycholsäuremethylester wurden in einer Lösung von wasserfreiem Pyridin und frisch destilliertem Essigsäureanhydrid 30 Stunden lang auf dem Wasserbad erwärmt und nach der Abkühlung in Eiswasser gegossen. Der dabei abgeschiedene Niederschlag wurde in Äther aufgenommen, mit verdünnter Salzsäure vom Pyridin befreit und mit Wasser gut gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die ätherische Lösung abgedampft und der Rückstand aus Methanol umkrystallisiert. Krystall vom Schmelzpt. 117°. Ausbeute 31 g.

3-Oxy-12-acetoxycholansäure.

31 g Diacetyl-desoxycholsäure-methylester wurden in der berechneten Menge von alkoholischer $N/2$ Kalilauge gelöst und in Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach einer Stunde wurde das Hydrolysat unter Neutralisierung mit verdünnter Salzsäure auf dem Wasserbad vom Alkohol befreit und dann durch weiteren Zusatz von Salzsäure ausgefällt. Die gut getrocknete Fällung wurde erst aus Essigäther, dann aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpt. 175°. Ausbeute 20 g.

3-Keto-12-acetoxycholansäure.

20 g 3-Oxy-12-acetoxycholansäure wurden in 200 ccm Eisessig gelöst und mit einer Chromsäurelösung (5 g CrO_3 in 50 ccm Eisessig) vorsichtig oxydiert. Die mit Wasser ausgefällte 3-Keto-12-acetoxycholansäure wurde aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Schmelzpt. 169°. Ausbeute 18 g.

3,640 mg Subst.: 9,605 mg CO_2 , 3,065 mg H_2O .

$\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_5$	Ber.	C 72,17	H 9,32
	Gef.	" 71,97	" 9,42.

3-Keto-12-oxycholansäure sintert bei 120° und schmilzt bei 132°. Nach Yamasaki u. Kyogoku (1935) soll diese freie Säure bei 112–120° schmelzen.

II. 3-Keto-4-brom-12-acetoxycholansäure.

7,5 g 3-Keto-12-acetoxycholansäure wurden in 100 ccm Eisessig gelöst und nach Zusatz eines Tropfens von Bromwasserstofflösung leicht erwärmend tropfenweise mit 60 ccm Brom-Eisessiglösung

(5 g Brom in 100 ccm Eisessig) versetzt.

Die Reaktionslösung wurde in Eiswasser gegossen, die dabei abgeschiedene Fällung in Äther aufgenommen und mit Wasser gut gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die ätherische Lösung abgedampft und der Rückstand aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Tafelförmige Krystalle vom Schmelzpt. 141° (sintern bei 133°). Ausbeute 7 g.

4,440 mg Subst.: 9,720 mg CO_2 , 2,860 mg H_2O .

$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{Br}\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	Ber. C 59,97	H 7,75
	Gef. " 59,71	" 7,21.

III. Δ^4 -3-Keto-12-acetoxycholensäure.

20 g 3-Keto-4-brom-12-acetoxycholensäure wurden in 200 ccm wasserfreiem Pyridin gelöst, unter Rückflusskühler auf dem Sandbad 5 Stunden lang erhitzt und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure eine Nacht in Kältemischung abkühlend stehen gelassen. Dabei erstarrte das Reaktionsgemisch zu einem Brei, der nach dem Trocknen unter Erwärmen mit absolutem Äther einige Stunden extrahiert wurde. Aus dieser ätherischen Lösung schied sich beim Stehen Δ^4 -3-Keto-12-acetoxycholensäure in Nadeln ab, die nach Umkrystallisation aus wasserfreiem Äther bei 158 – 160° schmolzen. Ausbeute 5 g. Bei der Liebermann-Burchardschen Reaktion zeigten sie eine karminrote Farbe. Sie entfärben die Permanganatlösung sofort und addieren Brom.

2,440 mg Subst.: 6,477 mg CO_2 , 1,930 mg H_2O .

$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_5$	Ber. C 72,50	H 8,90
	Gef. " 72,40	" 8,85.

Hydrierung der Δ^4 -3-Keto-12-acetoxycholensäure.

0,1455 g der Säure wurde in 10 ccm Eisessig gelöst und unter Zusatz von Platinoxid mit Wasserstoff geschüttelt. Dabei nahm die Lösung anfangs im Verlauf von 5 Minuten ein Mol. Wasserstoff auf. Die durch Zusatz von einer grossen Menge von Wasser aus der Reaktionslösung abgeschiedene Fällung wurde nach dem Trocknen in Essigester digeriert und dann aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Diese Säure schmolz bei 169° und zeigte bei der Mischprobe mit der 3-Keto-12-acetoxycholensäure keine Schmelz-

punktdepression.

Δ^4 -3-Keto-12-oxycholensäure.

1 g Δ^4 -3-Keto-12-acetoxycholensäure wurde mit 50 ccm einer 10%igen alkoholischen Kalilauge auf dem Wasserbad 2 Stunden erhitzt. Nach dem Verdampfen des Alkohols wurde die Lösung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die Fällung wurde aus Essigäther od. Alkohol umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpt. 240° . Die Säure ist in kaltem Alkohol schwer löslich.

3,550 mg Subst.: 9,610 mg CO_2 , 2,880 mg H_2O .

$\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_4$	Ber. C	74,18	H	9,34
	Gef. "	73,83	"	9,08.

Methylester. Die Säure wurde mit Diazomethan verestert und aus Methanol umkrystallisiert. Blättchen vom Schmelzpunkt 147 – 149° .

3,930 mg Subst.: 10,720 mg CO_2 , 3,270 mg H_2O .

$\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_4$	Ber. C	74,57	H	9,52
	Gef. "	74,39	"	9,31.

IV. Δ^4 - β -3-Oxy-12-acetoxycholensäure.

0,8 g Δ^4 -3-Keto-12-acetoxycholensäure wurde in 50 ccm trockenem Isopropylalkohol mit 20 g frischem Aluminiumisopropylat versetzt. Das Gemisch wurde ca. 2 Stunden unter der Trichterdecke auf dem Wasserbad leicht erhitzt und dann weiter 2 Stunden unter Rückflusskühler gekocht. Das fast bis zur Trockenheit eingegangene Reaktionsprodukt wurde in 5%iger Sodalösung ganz gelöst und abfiltriert. Das Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und die Fällung nach dem Trocknen in Äther aufgenommen. Dieser Ätherauszug wurde mit Wasser gewaschen, getrocknet, eingengt und die dabei abgeschiedenen Rohkrystalle aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Die Säure krystallisierte in prismatischen Nadeln und schmolz bei 186° . Ausbeute 0,5 g. Bei der Liebermannschen Reaktion zeigte sie anfangs violettrote und dann kirschrote Farbe.

4,410 mg Subst.: 11,615 mg CO_2 , 3,550 mg H_2O .

$\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_5$	Ber. C	72,17	H	9,32
	Gef. "	71,83	"	9,01.

Δ^4 - β -3- α -12-Dioxycholensäure.

0,5 g Δ^4 - β -3-Oxy-12-acetoxycholensäure wurde mit 50 ccm einer 10%igen alkoholischen KalilaugeLösung auf dem Wasserbad 2 Stunden hydrolysiert. Nach dem Verdampfen des Alkohols wurde das Hydrolysat mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die rohe Säure wurde zuerst in Essigester aufgenommen und dann aus Aceton-Wasser od. Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Schuppen vom Schmelzpt. 201°. Liebermannsche Reaktion: violettrot-dunkelrot.

spez. Drehung: 0,040 g Subst. in 5 ccm Alkohol,

$$l=1 \text{ dm, } \alpha = +0,43^\circ \quad [\alpha]_D = +53,75^\circ$$

3,520, 3,550 mg Subst.: 9,480, 9,580 mg CO₂, 2,980, 3,030 mg H₂O.

C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ber. C 73,78	H 9,81
	Gef. " 73,45, 73,60	" 9,47, 9,55.

Methylester. Der mit Diazomethan hergestellte Ester krystallisierte aus Methanol-Wasser in Nadeln und schmolz bei 108–110°. *Umlagerung* der Säure in Δ^5 - β -3- α -12-Dioxycholensäure.

0,1 g Δ^4 - β -3- α -12-Dioxycholensäure wurde in einer 10%igen Alkalilösung 2 Stunden gekocht. Der mit verdünnter Salzsäure ausgefällte Niederschlag wurde nach dem Trocknen in Essigester digeriert und aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpt. 161°.

Diese Säure wurde auch in folgender Weise gewonnen. 0,1 g Δ^4 - β -3- α -12-Dioxycholensäure wurde in 10 ccm Essigsäureanhydrid 2 Stunden erhitzt. Die durch Zusatz von Wasser abgeschiedene Fällung wurde mit einer 3%igen Alkalilösung hydrolysiert. Die durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure ausgefällte Säure wurde nach dem Trocknen in Essigester digeriert und aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpt. 161°.

Reduktion von 3-Keto-12-acetoxycholansäure mit Aluminiumisopropylat.

1 g 3-Keto-12-acetoxycholansäure wurde in 20 ccm trockenem Isopropylalkohol mit 10 g frischem Aluminiumisopropylat versetzt. Das Gemisch wurde ca. eine halbe Stunde unter der Trichterdecke auf dem Wasserbad leicht erhitzt und dann weiter anderthalb Stunden unter Rückfluss gekocht. Das fast bis zur Trockenheit

eingeeengte Reaktionsprodukt wurde in einer 5%igen Sodalösung gelöst und von der grauweissen teigigen Masse abfiltriert. Die unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure abgeschiedene Fällung wurde in Äther aufgenommen. Die nach dem Einengen des Ätherauszuges erhaltenen Rohkrystalle wurden mit 50 ccm einer 10%igen Kalilauge auf dem Wasserbad 2 Stunden hydrolysiert. Die Lösung wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Die dabei abgeschiedene Fällung wurde in Äther aufgenommen. Die nach Abdampfen des Äthers erhaltenen Rohkrystalle wurden aus Eisessig umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzpt. 145° . Diese Säure zeigte bei der Mischprobe mit der Eisessigheleinsäure keine Schmelzpunktdepression.

V. *Katalytische Hydrierung der Δ^4 - β -3- α -12-Dioxycholensäure.*

1. *β -3- α -12-Dioxy-allocholansäure.*

200 mg der ungesättigten Säure wurden in 10 ccm absolutem Alkohol gelöst und unter Zusatz von 100 mg Platinoxid nach Adams und unter Wasserstoff geschüttelt. Im Verlauf von 10 Minuten nahm die Lösung 1 Mol. Wasserstoff auf. Nach weiteren 10 Minuten wurde die Lösung vom Platinoxid abfiltriert, durch Zusatz von einer grossen Menge Wasser gefällt und die Fällung nach dem Trocknen in Äther digeriert. Diese Masse wurde aus Alkohol-Wasser od. aus Methanol-Wasser umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpt. 230° . Ausbeute ca. 50 mg. Bei der Liebermannschen Reaktion zeigten sie eine kirschrote Farbe.

Spezifische Drehung: 0,033 g Subst. in 5 ccm Methanol,

$$l = 1 \text{ dm}, \quad \alpha = +0,25^{\circ} \quad [\alpha]_D = +37,87^{\circ}$$

3,905 mg Subst.: 10,530 mg CO_2 , 3,385 mg H_2O .

$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4$	Ber. C 73,41	H 10,27
	Gef. " 73,54	" 9,70.

Methylester. In üblicher Weise wurde der Ester mittelst Diazomethans dargestellt. Der Ester begann bei 87° zu sintern und schmolz bei 140° . Durch Zusatz einer alkoholischen Digitoninlösung wurde die Lösung des Methylesters gefällt.

3.12-Diketo-allocholansäure.

1 g β -3- α -12-Dioxy-allocholansäure wurde in 10 ccm Eisessig gelöst, mit 10 ccm einer 10%igen Chromsäure-Eisessiglösung tropfenweise versetzt und nach halbstündigem Stehen in Zimmertemperatur durch Zusatz von Wasser vorsichtig gefällt. Die Fällung wurde abfiltriert, mit Wasser gut gewaschen, getrocknet und aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Tafeln vom Schmelzpt. 225°. Ausbeute ca. 500 mg.

4,110 mg Subst.: 11,140 mg CO₂, 3,310 mg H₂O.

C ₂₄ H ₃₀ O ₄	Ber.	C 74,17	H 9,34
	Gef.	" 73,92	" 9,01.

Clemmensen-Reduktion von 3-12-Diketo-allocholansäure.

500 mg 3-12-Diketo-allocholansäure wurden mit 20 g amalgamiertem Zink in 50 ccm Eisessig gelöst und unter Zusatz von 50 ccm konz. Salzsäure in mehrere Fraktionen geteilt, auf dem Sandbad 12 Stunden gekocht. Das dabei abgeschiedene Öl wurde nach Abkühlung durch Zusatz einer grossen Menge Wasser völlig ausgefällt, abgesaugt und getrocknet. Nach häufigem Umlösen aus Alkohol und dann aus Eisessig wurden Schuppen vom Schmelzpt. 168° gewonnen. Ausbeute ca. 50 mg.

Diese Säure zeigte bei der Mischprobe mit der aus Dehydrocholsäure bereiteten Cholansäure vom Schmelzpt. 163° deutliche Depression, aber mit der aus β -Dehydrohyodesoxycholsäure erhaltenen Allocholansäure keine Schmelzpunktdepression.

3,720 mg Subst.: 10,885 mg CO₂, 3,660 mg H₂O.

C ₂₄ H ₄₀ O ₂	Ber.	C 79,93	H 11,19
	Gef.	" 79,80	" 11,01.

2. β -3- α -12-Dioxycholansäure.

Der von der β -3- α -12-Dioxy-allocholansäure befreite Ätherauszug wurde abgedampft. Der Rückstand wurde zuerst aus Aceton und dann aus Methanol-Wasser einige Male oder aus Eisessig-Wasser umkrystallisiert. Glänzende Prismen vom Schmelzpt. 178° (bei 145° starkes Sintern).

Liebermann-Reaktion: kirschrot-braunrot.

Spezifische Drehung: 0,0410 g Subst. in 5 ccm Methanol,

$$l = 1 \text{ dm}, \quad \alpha = +0,31^\circ \quad [\alpha]_D^{20} = +37,80^\circ$$

4,080 mg Subst.: 10,965 mg CO₂, 3,646 mg H₂O.

C ₂₄ H ₄₀ O ₄	Ber. C 73,41	H 10,27
Gef. " 73,30	" 10,00.	

Methylester. Der mittelst Diazomethans hergestellte Ester krystallisiert in Prismen vom Schmelzpt. 155–156° und seine alkoholische Lösung ist durch Digitonin fällbar.

3,500 mg Subst.: 9,458 mg CO₂, 3,185 mg H₂O.

C ₂₅ H ₄₂ O ₄	Ber. C 73,83	H 10,41
Gef. " 73,70	" 10,18.	

Oxydation der β -3- α -12-Dioxycholansäure.

100 mg β -3- α -12-Dioxycholansäure wurden in üblicher Weise mit Chromsäure oxydiert und Dehydrosäure vom Schmelzpt. 188° erhalten. Ausbeute ca. 50 mg. Keine Schmelzpunktdepression mit der reinen Dehydrodesoxycholsäure vom Schmelzpt. 189°.

Zum Schluss danke ich den Herren Prof. Dr. T. Shimizu und Prof. T. Kazuno bestens für ihre freundliche Leitung und Unterstützung bei meinen Versuchen.

LITERATUR.

Noguchi, T. (1931): Z. Physiol. Chem., **194**, 248.

Windaus, A. (1927): Liebig's Ann., **453**, 101.

Yamasaki, K. u. Kyogoku, K. (1935): Z. Physiol. Chem., **233**, 29.

ÜBER DIE SYNTHESE DER β -ALLODESOXYCHOL-SÄURE AUS CHOLSÄURE.

VON

KENZI MATUMOTO.

(Aus dem Biochemischen Institut Okayama.

Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 24. Juli 1942.)

Die in der Galle vorkommenden Gallensäuren von 24 Kohlenstoffatomen sind bekanntlich Abkömmlinge der Cholsäure, die als Stammsäure betrachtet wird. Neuerdings haben Fernholz (1935) und Sugiyama (1937) aus der Schweinegalle eine Keto-säure der Allocholansäurereihe, 3-Oxy-6-keto-allocholansäure, als Acetat isoliert. Aber diese Ketosäure ist unter Hydrolyse der Galle gewonnen worden. Sie sollte daher in der Schweinegalle als 3-Oxy-6-keto-cholansäure vorhanden sein, die 3-Oxy-6-keto-allocholansäure wird also als Kunstprodukt betrachtet, indem die 3-Oxy-6-keto-cholansäure in ein Allocholansäurederivat durch Alkali umgelagert wurde. Ausserdem wurden bei den Studien über die Epimerisierung der OH-Gruppen des Gallensäuremoleküls einige Gallensäuren der Alloreihe experimentell aus dem Harn oder aus der Galle von verschiedenen Tieren vorgefunden. So hat S. Miyazi (1938) β -Dehydrohyodesoxycholsäure dem Kaninchenorganismus intravenös verabreicht und in seinem Harn β -3- α -6-Dioxyallocholansäure aufgefunden und andererseits hat Tukamoto (1939) eine partiell hydrierte β -3-Oxy-6-keto-allocholansäure aus dem Harn der Kröten erhalten, denen α -Dehydrohyodesoxycholsäure einverleibt wurde. Von synthetischen Gallensäuren der Alloreihe sind bisher auch einige bekannt und zwar wurde α -3-Oxy-allocholansäure (Wieland u. Dane 1932) aus Hyodesoxycholsäure und β -3-Oxy-allocholansäure (Stange 1933) aus Cholesterin dargestellt. Um die stereochemische Konstitution und die physiologischen Eigenschaften der Gallensäuren der Alloreihe festzustellen, habe ich bereits β -Allodesoxycholsäure (Matumoto 1942) (β -3- α -12-Dioxy-

allocholsäure) aus Desoxycholsäure synthetisch dargestellt. Mit dieser Methode wurde hierbei die Synthese von Allocholsäure aus Cholsäure vorgenommen. Dabei wurde aber wider Erwarten nicht Allocholsäure sondern β -Allo-desoxycholsäure erhalten.

Von T. S. Sihm (1938) wurde bereits 3-Keto-7.12-diacetoxycholansäure (II) aus Triacetylcholsäure-methylester (I) dargestellt. Lässt man auf diese Mono-ketosäure 1 Mol. Brom in Eisessiglösung einwirken, so erhält man 3-Keto-4-brom-7.12-diacetoxycholansäure (III) vom Schmelzpt. 207–208°.

Das Bromatom tritt bevorzugt (Butenandt u. Mamoli 1935) bei der Cholsäurereihe in der Stellung an C₄ ein. Dieses Bromid wurde durch Kochen auf dem Sandbad in wasserfreiem Pyridin unter Abspaltung eines Mols von Bromwasserstoff (Butenandt u. Wolff 1935) in eine ungesättigte $\Delta^{4,7}$ -3-Keto-12-acetoxycholadiensäure (IV) vom Schmelzpt. 212° übergeführt. Bei der Cholsäurereihe wurde durch Entbromung erwartungsgemäss die eine Doppelbindung in der Stellung an C₄₋₅ und in diesem Fall noch eine andere Doppelbindung in der Stellung an C₇₋₈ gebildet. Wahrscheinlich ist hierbei erst die Acetylgruppe in der Stellung an C₇ hydrolytisch und dann die dabei gebildete sekundäre Alkoholgruppe unter Wirkung des Bromwasserstoffs abgespalten worden, um die Doppelbindung entstehen zu lassen, wie die Cholsäure durch wasserentziehende Reagentien leicht in eine Dioxycholsäure (Bödecker u. Volk 1921) übergeführt wird, die katalytisch leicht zu Desoxycholsäure hydriert wird.

Durch Reduktion mit Aluminiumisopropylat nach Meerwein-Pondorf (1925, 1926) wurde aus dieser doppelt ungesättigten Monoacetoxy-monoketosäure $\Delta^{5,7}$ - β -3-Oxy-12-acetoxycholadiensäure (V) vom Schmelzpt. 167° erhalten, die deutliche Hammarstenische Reaktion zeigte. Theoretisch sollten aus der Mono-ketosäure durch Reduktion nach Meerwein-Pondorf zwei Stereoisomeren gewonnen werden. So hat M. Tukamoto (1940) durch diese Reduktionsmethode aus Dehydrohydodesoxycholsäure, 3.6-Diketocholansäure, 4 stereoisomere Oxy-säuren erhalten, von denen die α -Form der HO-Gruppe vorherrschend ist, während bei der 3-Keto-12-acetoxy- $\Delta^{4,7}$ -choladiensäure hauptsächlich die β -Form, nicht aber die α -Form,

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Nach der Schrift von Wieland u. Kapitel (1932) wurde Triacetylcholsäuremethylester aus Cholsäuremethylester (60 g aus 60 g) und weiter nach der von Sihm (1938) aus diesem Triacetat durch partielle Hydrolyse und weitere partielle Oxydation mit Chromsäure 3-Keto-7.12-diacetoxycholansäure vom Schmelzpt. 197–198° erhalten (25,5 g aus 33 g).

1. 3-Keto-4-brom-7.12-diacetoxycholansäure.

25,5 g 3-Keto-7.12-diacetoxycholansäure wurden bei Zimmertemperatur in 100 ccm Eisessig gelöst und unter Zusatz von einem Tropfen 20%iger Bromwasserstofflösung mit berechneter Menge, 166 ccm einer 5%igen Brom-Eisessiglösung tropfenweise versetzt, wobei sich die Lösung nach 30 Minuten vollständig entfärbte. Nach einer Stunde wurde die Reaktionslösung in Wasser gegossen und über Nacht stehen gelassen. Die dabei abgeschiedene Fällung wurde abgenutscht, mit Wasser gut gewaschen, getrocknet und aus Alkohol umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpt. 207–208°. Ausbeute 21 g.

2. $\Delta^{4,7}$ -3-Keto-12-acetoxycholadiensäure.

23 g der gebromten Ketosäure wurden in 200 ccm wasserfreiem Pyridin gelöst und 15 Stunden auf dem Sandbad zum Sieden erhitzt. Die mit Wasser stark verdünnte Lösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und die Fällung in Essigester gelöst. Der Essigesterauszug wurde abgedampft und aus Alkohol mehrmals umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 212°. Der Krystall zeigt eine positive Jaffesche Reaktion und bei Liebermannscher Reaktion eine anfangs grüne und dann kirschrote Farbe, aber keine Beilsteinsche Reaktion. Ausbeute 6 g.

3,715 mg Subst.: 9,900 mg CO₂, 2,680 mg H₂O.

C ₂₆ H ₃₆ O ₅	Ber.	C 72,84	H 8,47
	Gef.	" 72,68	" 8,07.

$\Delta^{4,7}$ -3-Keto-12-oxycholadiensäure:

Die freie Säure wurde in üblicher Weise nach der Hydrolyse der $\Delta^{4,7}$ -3-Keto-12-acetoxy-choladiensäure und durch häufiges Um-lösen aus Alkohol gewonnen. Säulen vom Schmelzpt. 250–253°.

3,680 mg Subst.: 10,050 mg CO₂, 2,840 mg H₂O.

C ₂₄ H ₃₄ O ₄	Ber.	C 74,57	H 8,87
	Gef.	" 74,48	" 8,63.

Hydrierung zur Desoxycholsäure:

2 g $\Delta^{4,7}$ -3-Keto-12-acetoxycholadiensäure wurden in 20 cem Eisessig mit Platinoxid und Wasserstoff geschüttelt. Die Lösung wurde vom Platin befreit, mit Wasser gefällt und der Rückstand in üblicher Weise hydrolysiert. Die durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure aus Hydrolysat erhaltene Fällung wurde nach dem Trocknen aus Äther umkrystallisiert. Blättchen vom Schmelzpt. 170° (starkes Sintern bei 150°). Aus Eisessig krystallisierte sie in Nadeln vom Schmelzpt. 142°, die mit Essig-choleinsäure keine Schmelzpunktdepression zeigten. Ausbeute 0,8 g. Die Säure gab keine Hammarstense und Jaffesche Reaktion und zeigte bei Liebermannscher Reaktion eine braunrote Farbe. Diese Säure wurde in üblicher Weise durch Oxydation mit Chromsäure in die bekannte Dehydrodesoxycholsäure vom Schmelzpt. 184° verwandelt, die aus Alkohol-Wasser in Schuppen krystallisierte und weiter durch Clemmensensche Reduktion in die in glänzenden Nadelchen vom Schmelzpt. 163° krystallisierte Cholsäure übergeführt wurde.

3. $\Delta^{5,7}$ - β -3-Oxy-12-acetoxycholadiensäure.

2 g $\Delta^{4,7}$ -3-Keto-12-acetoxycholadiensäure wurden in 20 cem Isopropylalkohol gelöst, mit einem Gemisch von 25 g Aluminiumisopropylat und 15 cem Isopropylalkohol versetzt und erst 3 Stunden unter Abschluss der Feuchtigkeit und dann weiter 5 Stunden unter Rückflusskühlung auf dem Wasserbad gekocht. Die Reaktionslösung wurde nach Abdampfen des Alkohols völlig getrocknet, dann in 1%iger Sodalösung gekocht, abfiltriert und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure gefällt.

Diese Fällung wurde in Äther aufgenommen und der aus dem Ätherauszug erhaltene Rückstand aus Essigester umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 167°. Ausbeute 0,6 g. Sie

zeigten eine positive Hammarstense Reaktion und bei Liebermannscher Reaktion eine anfangs blauviolette, später dunkelbraune Farbe.

3,820 mg Subst.: 10,105 mg CO₂, 2,880 mg H₂O.

C ₂₆ H ₃₈ O ₅	Ber.	C 72,50	H 8,90
	Gef.	" 72,14	" 8,44.

$\Delta^{5,7}$ - β -3- α -12-Dioxycholadiensäure:

Das Monoacetat wurde in üblicher Weise mit KalilaugeLösung auf dem Wasserbad 2 Stunden lang gekocht und dann mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die Fällung wurde erst aus Essigäther, dann aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Spindelförmige Nadeln vom Schmelzpt. 184°. Liebermannsche Reaktion: anfangs blauviolett, dann violettrot mit grüner Fluoreszenz. Im Spektrum erschien ein für konjugierte Doppelbindungen charakteristisches Absorptions-Maximum bei etwa 242 m μ .

4. β -3-Oxy-12-acetoxy-allocholsäure.

0,3 g $\Delta^{5,7}$ - β -3-Oxy-12-acetoxycholadiensäure wurden in 5 ccm Alkohol mit 0,05 g Platinoxid unter Wasserstoff geschüttelt. Dabei nahm die Lösung 2 Mol. Wasserstoff auf. Das vom Platinoxid abfiltrierte Filtrat wurde durch Zusatz von Wasser gefällt, in Äther aufgenommen und dann der aus Ätherauszug erhaltene Rückstand aus Essigester mehrmals umkrystallisiert. Feine Schuppen vom Schmelzpt. 205°. Ausbeute 0,06 g.

3,960 mg Subst.: 10,400 mg CO₂, 3,315 mg H₂O.

C ₂₆ H ₄₂ O ₅	Ber.	C 71,83	H 9,74
	Gef.	" 71,63	" 9,37.

5. β -3- α -12-Dioxyallocholsäure (β -Allodesoxycholsäure).

Das obenerwähnte Acetat wurde in 10%iger KalilaugeLösung von Zeit zu Zeit unter Ersatz von wenig Alkohol auf dem Wasserbad 3 Stunden lang gekocht. Die durch Ansäuern erhaltene freie Säure krystallisierte nach häufigem Umlösen aus Essigester in Prismen vom Schmelzpt. 233–234°.

Sie zeigten keine Hammarstense Reaktion und bei Liebermannscher Reaktion eine gelbrote Farbe. Keine Schmelzpunkt-

depression mit der synthetisch aus Desoxycholsäure erhaltenen β -3- α -12-Dioxyallocholsäure.

Spezifische Drehung: 0,0367 g Subst., in 5 ccm Methanol,

$l = 1$ dm, $\alpha = +0,28$ $[\alpha]_D = +38,15$.

3,365 mg Subst.: 9,080 mg CO₂, 2,950 mg H₂O.

C ₂₄ H ₄₀ O ₄	Ber.	C 73,41	H 10,27
	Gef.	" 73,59	" 9,81.

Methylester: Die Säure wurde in üblicher Weise mit ätherischer Diazomethanolösung verestert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Ester aus Methanol-Wasser umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzpt. 145° (sintern bei 78°). Der Ester ist in Alkohol durch alkoholische Digitoninlösung fällbar.

3,12-Diketo-allocholsäure: 0,4 g β -3- α -12-Dioxyallocholsäure wurde in 10 ccm Eisessig mit einer Lösung von 0,4 g Chromsäure in 5 ccm Eisessig tropfenweise versetzt und nach 30 Minuten mit Wasser gefällt. Die dabei abgeschiedene Fällung wurde abfiltriert und erst aus Alkohol-Wasser, dann Aceton-Wasser umkrystallisiert. Schuppen vom Schmelzpt. 222°.

3,370 mg Subst.: 9,130 mg CO₂, 2,790 mg H₂O.

C ₂₄ H ₃₆ O ₄	Ber.	C 74,17	H 9,34
	Gef.	" 73,89	" 9,26.

Clemmensen-Reduktion zur Allo-cholsäure: 0,2 g 3,12-Diketo-allocholsäure wurde mit 5 g amalgamiertem Zink in 15 ccm Eisessig versetzt und weiter mit 20 ccm konz. Salzsäure auf dem Sandbad bis zum Sieden 8 Stunden lang erhitzt. Die dabei ausgeschiedene Substanz wurde nach Abkühlung abfiltriert, in Alkohol aufgenommen und dann aus Eisessig mehrmals umkrystallisiert. Schuppen vom Schmelzpt. 168°. Bei der Mischprobe mit Cholsäure vom Schmelzpt. 168° ergaben sie deutliche Depression, aber mit der nach Clemmensen aus 3,6-Diketo-allocholsäure erhaltenen Allo-cholsäure vom Schmelzpt. 165° keine Depression.

3,720 mg Subst.: 10,885 mg CO₂, 3,660 mg H₂O.

C ₂₄ H ₄₀ O ₂	Ber.	C 79,93	H 11,19
	Gef.	" 79,80	" 11,01.

Allocholsäure-methylester: Mittelst Diazomethans dargestellt.

Erst aus Äther, dann Methanol-Wasser umkrystallisiert. Schuppen vom Schmelzpt. 84° .

3,035 mg Subst.: 8,900 mg CO_2 , 3,035 mg H_2O .

$\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_2$	Ber.	C 80,15	H 11,31
	Gef.	" 79,98	" 11,19.

Zum Schluss möchte ich den Herren Prof. T. Shimizu und Prof. T. Kazuno für ihre freundliche Leitung und Unterstützung bei meinen Versuchen meinen herzlichen Dank aussprechen.

LITERATUR.

- Bödecker, F. u. Volk, H. (1921): Ber. Chem. Ges., **54**, 2489.
 Butenandt, A. u. Mamoli, L. (1935): Ber. Chem. Ges., **68**, 1854.
 Butenandt, A. u. Wolff, A. (1935): Ber. Chem. Ges., **68**, 2091.
 Fernholz, E. (1935): Z. Physiol. Chem., **232**, 202.
 Matumoto, K. (1943): J. of Bioch., **36**, 173.
 Mauthner, J. (1909): Monatsh., **30**, 635.
 Meerwein, H. u. Schmidt, R. (1925): Liebig's Ann., **444**, 221.
 Miyazi, S. (1938): Z. Physiol. Chem., **254**, 104.
 Pondorf, W. (1926): Z. Ang. Chem., **39**, 138.
 Sihm, T. S. (1938): J. of Bioch., **27**, 427.
 Stange, O. (1933): Z. Physiol. Chem., **220**, 34.
 Sugiyama, G. (1937): J. of Bioch., **25**, 157.
 Tukamoto, M. (1939): Z. Physiol. Chem., **260**, 210.
 Tukamoto, M. (1940): J. of Bioch., **32**, 451.
 Windaus, A. (1927): Liebig's Ann., **453**, 101.
 Wieland, H. u. Dane, E. (1932): Z. Physiol. Chem., **212**, 41.

STUDIES ON THE PASTEUR REACTION IN MUSCLE.

By

YOSINOBU IWAKAWA.

(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical College.

Director: Prof. N. Ariyama.)

(Received for publication, August 4, 1942)

No definition applied to the Pasteur reaction is satisfactory, since the true nature of the reaction has yet been obscure. It may still be permissible from the original observation of Pasteur to define the reaction as that which involves the diminution or the suppression of glycolysis in the presence of oxygen. Since this reaction correlates the two important energy-supplying reactions, namely glycolysis and oxidation, it has long been one of the most interesting problems in biochemistry; and a large number of hypotheses has been postulated with reference to the mechanism of the reaction. No attempt is made here to review the entire literatures, but these hypotheses may be classified into the following four different groups.

1) It is assumed in the hypotheses of the first group that oxidation takes place at a certain stage of glycolysis; in other words, the anaerobic breakdown of carbohydrate furnishes substances for the subsequent oxidation. In his classical cycle theory, Meyerhof (1920, 1925) postulated that, at the recovery stage following the contracture of the intact frog muscle, four fifths of the lactic acid produced was re-synthesized to carbohydrate at the expense of the energy supplied by oxidation of the remaining one fifth of the acid. Pyruvic acid was also found by Meyerhof et al. (1925) to behave in a way similar to lactic acid; it accelerated respiration and gave rise to the re-synthesis of carbohydrate when perfused through frog muscle. The cycle theory has failed to satisfy, however, the later experiments, at least when muscle slices were used instead of the intact muscle. Though a marked decrease in the lactic acid production has also been noticed in muscle slices under aerobic conditions, there has been no positive indication

of the re-synthesis of carbohydrate.

The failure of the cycle theory to afford a satisfactory explanation to the nature of the Pasteur reaction in muscle slices created the unitary theory, in which the oxidative removal of the glycolytic intermediary products are assumed to cover, to a large extent, the decrease in the lactic acid production in the presence of oxygen. Among the glycolytic products, lactic acid was the first to receive examination, but there is at present no convincing evidence in support of this view. There has been an abundant evidence which places much importance to pyruvic acid as the key substance to carbohydrate oxidation. Krebs and Eggleston (1940), and Krebs (1940) stated that the oxidation of pyruvate constituted a part of the normal respiration of pigeon breast muscle, and that the citric acid cycle of Krebs and Johnson (1937) and the C_4 -dicarboxylic acids cycle of Szent-Györgyi were involved in the reaction. From the result of an experiment with heart muscle, Smyth (1940) reached the same conclusion as Krebs. Szent-Györgyi's view (1937) is as follows: Hexose is first split into triose. In the absence of oxygen, the triose is converted into pyruvic acid, two atoms of hydrogen being transferred from a molecule of triose to a molecule of the preformed pyruvic acid, which is then reduced to lactic acid. In the presence of oxygen, the triose is oxidized by liberating two atoms of hydrogen which are accepted by the C_4 -dicarboxylic acids system. Kutscher and his co-workers (1940) attributed the cause of the Pasteur reaction to the removal of intermediary products (diphosphoglyceric acid or diphosphoglyceraldehyde) by dehydrogenation, hydrogen atoms of these substances being transported to the Warburg-Keilin system through the C_4 -system.

Boyland and Boyland (1935) observed that, in the presence of oxygen, triosephosphate was converted by dialyzed tissue extracts into some more stable compound. They deduced from this finding that the Pasteur reaction might have resulted from the oxidative removal of triosephosphate. Oppenheimer (1939) is of opinion that the oxidation takes place at the stage of C_3 -bodies, which are the common products of the aerobic and anaerobic breakdown of

carbohydrate. Harrison (1931 i) isolated from ox liver a special dehydrogenase for hexosediphosphate. However, nothing is known about the part assignable to this enzyme in biological oxidation. The discovery of dehydrogenase of the Warburg system has given a great significance to hexosemonophosphate as the intermediate of the Pasteur reaction, though there has been no convincing evidence which connects the oxidation of the Robison ester with the Pasteur reaction. Ostern and Holmes (1934) found that phosphorylation and breakdown of glycogen by the hepatic action took place more rapidly in the presence of oxygen than in its absence, and they inferred this to be due to the oxidative removal of some intermediary product, such as the Robison ester. Kodama (1932) and Tsukano (1932) demonstrated, in animal tissues, the presence of "biozucker" which had an approximate composition of hexosemonophosphate. The corresponding dehydrogenase was also found in tissues. The biological significance of this dehydrogenase system is, however, unknown. Engelhardt and Barchaseh (1938) supposed that the direction of the aerobic and anaerobic breakdown of sugar by the macerated yeast extract might be determined at the stage of hexosemonophosphate. The finding that the formation of the Robison ester from glycogen by the action of tissue extracts decreased in the aerobic condition, led Gill and Lehmann (1939) to the deduction that the Robison ester might not be an intermediate of the oxidative breakdown of carbohydrate. Barron and his co-workers (1928, 1929, 1929-30) observed that the addition of methylene blue to erythrocytes, leucocytes, and eggs of starfish and of sea urchin, caused an increase in the oxygen consumption on the one hand, and an increase in sugar destruction and a decrease in the lactic acid production on the other hand. They attributed this effect of the dye to its shifting action on the course of the carbohydrate breakdown from the anaerobic direction to the aerobic, since the dye caused the oxidation of the glycolytic intermediates at an earlier stage of glycolysis, probably before the decomposition of glucose molecule into C_3 -fragments.

As mentioned above, the hypotheses of the first group appear to be very attractive and plausible. But it is yet premature

to conclude, as Oppenheimer did, that the Pasteur reaction originates in the change of the direction of the anaerobic course of glycolysis at a certain stage into the oxidative.

2) The hypotheses of the second group deal with the direct oxidation of sugar molecule along a course quite different from that of glycolysis. These hypotheses have been derived from the fact that glycolysis can be separated from respiration under certain conditions. Lundsgaard (1930) showed that monoiodoacetate suppressed or markedly reduced fermentation of yeast without affecting respiration. This initiated his inference that oxidation might take place independent of anaerobic glycolysis. Many experimental results have been reported for and against this hypothesis. Krebs (1931), Meyerhof and Boyland (1931), and Quastel and Wheatley (1932 i) observed that the respiration of the tissues which were poisoned with monoiodoacetate continued, independent of glycolysis, at the expense of the preformed lactate or pyruvate. Then, it is little wonder that respiration is separable from glycolysis. However, Lundsgaard's hypothesis has again received the support of recent investigators. Stannard (1937), and Saslow (1937) reported that RQ of the normal and caffeinized frog muscle maintained values over 0.9 after the complete inhibition of glycolysis with monoiodoacetate. Shorr et al. (1938), and Barker et al. (1939) observed the similar phenomenon, and assumed that carbohydrate oxidation might not be connected with the anaerobic mechanism. Fazekas and Himwich (1936) stated that nicotine inhibited the oxidation of lactate in normal and diabetic brains of cats, dogs, and rats, without affecting the oxidation of glucose. Lasser's finding (1937 ii), which showed that carbon monoxide inhibited the Pasteur reaction without exerting a profound influence on respiration, seems to indicate that there may be no close connection between the Pasteur reaction and respiration. Michaelis and Smythe (1936) could not find any direct correlation between the oxygen uptake and the inhibiting effect of various dyes on aerobic fermentation of the yeast extract. Bumm and his co-workers (1934), and Lasser (1937 i) observed that the respiration of various tissues remained unchanged at a wide range of the oxygen

tension while aerobic glycolysis increased at a lower tension. Bumm and his co-workers expressed a view that there was, at least in the intestinal mucosa, no direct bearing between respiration and glycolysis. Laser concluded that Pasteur reaction was more intimately dependent on the oxygen tension than on respiration. Further study on the biological significance of Harrison's glucose-dehydrogenase (1931 ii, 1932, 1933) may throw light on the mechanism of the direct oxidation of carbohydrate.

3) The hypotheses of the third group attempt to trace the cause of the Pasteur reaction to the oxidative inhibition of the action of the glycolytic enzyme system. Lipmann (1933, 1934 i) stated that the Pasteur reaction might originate from the reversible, oxidative inactivation of the glycolytic enzyme in the presence of oxidizing agents. Hoogerheide (1935) believed that the Pasteur reaction was explainable, partly by the reversible inactivation of the zymase system by oxygen, and partly by the oxidative removal of the glycolytic intermediates. Chaix and Fromageot (1939) reported that the action of the enzyme system responsible for the degradation of hexose into C_3 -compounds by propionic bacteria was inhibited by oxygen. Michaelis and Smythe (l. c.) found that methylene blue, pyocyanine, thionine, and other dyes inhibited the aerobic fermentation of the Lebedev extract by destroying irreversibly the enzyme system, while 1-naphthol-2-sulfonate and other dyes lowered the aerobic fermentation by inhibiting the formation of fructosediphosphate. Lennerstrand (1937) postulated that the aerobic blockade of fermentation might result from the fixation of adenylic acid to adenosinetriphosphate; in other words, it might result from the diminution of adenylic acid, the phosphate acceptor, in the presence of oxygen. Rapkine (1938) observed that oxidation-reduction between triosephosphate and pyruvate was inhibited by iodine and oxidized glutathione. Gill and Lehmann (l. c.) noticed the inhibiting effect of oxidizing compounds, such as catechol + catechol oxidase, on the formation of Robison's ester from glycogen by muscle extracts. Gemmill and Hellerman (1937) found that phenylmercuric hydroxide and other mercuric compounds inhibited the aerobic glycolysis of the

extract of frog muscle presumably at the hexose stage, and concluded that the glycolytic process was under the oxido-reductive control. Lynen (1941) tried to trace the cause of the Pasteur reaction in yeast fermentation to the retardation of the glycolytic process at the stage of dehydrogenation of 3-phosphoglyceraldehyde.

The fact that the glycolysis is inhibited by the positive oxydo-reduction systems leads us to expect that the reaction thus inhibited may be restored, or that the enzyme may be protected from the oxidative inactivation by adding reducing reagents, such as reduced glutathione, cysteine, hydrogen sulphide etc. This has been confirmed by Lipmann (l.c.), Rapkine (l.c.), Gemmill and Hellerman (l.c.), Chaix and Fromageot (l.c.), and others. The increase of aerobic glycolysis, that is, the inhibition of the Pasteur reaction by reducing reagents, can be understood on the same ground—Quastel and Wheatley (1932 ii), Bumm and his co-workers (1932, 1934), Dickens (1935, 1936), Weil-Malherbe (1938), Runnström and his co-workers (1937, 1938, 1939), Chaix and Fromageot (l.c.), and others.

Many investigators have a good reason to assume that the inhibitory action of the reducing reagents upon the Pasteur reaction may be due to the removal of heavy metals which exert the inhibitory effect on glycolysis—Krah (1930), Mendel (1933), Euler (1933), Bierich and Rosenbohm (1934), Lipmann (1934 ii), Wagner-Jauregg and Rzeppa (1936), Gemmill and Hellerman (l.c.), Rapkine (l.c.), Geiger and Magnes (1939), Gill and Lehmann (l.c.), and others. The inhibition of the Pasteur reaction by ethylisocyanide (Warburg) may belong to this category.

Hahn and his co-workers (1937, 1938, 1939) stated that there was present in ox muscle a substance which called forth the Pasteur reaction by inhibiting the production of lactic acid in muscle under aerobic conditions.

4) In the fourth group of the hypotheses, the Pasteur reaction is considered to be connected with the permeability of the cell membrane or with the colloidal state of protoplasm. It is a well-known fact that carbohydrate metabolism in yeast and animal

tissues is greatly influenced by potassium and other cations. Ashford and Dixon (1935), Dixon and Holmes (1935), and Dixon (1936 i) offered the following explanation for the action of potassium which inhibits the Pasteur reaction and increases the respiration of the brain. They suggested that the Pasteur reaction might be caused by the decrease in permeability of the cell membrane toward glucose under aerobic conditions, the accessibility between the glycolytic enzymes and the substrates being consequently decreased. The inhibiting effect of potassium and other cations on the Pasteur reaction in the brain was attributed by the investigators mentioned above to the increase of permeability and to the subsequent increase of the accessibility between the enzymes and the substrates. According to Dickens and Greville (1935), the effect of potassium is due to a change in the colloidal state of protoplasm of the brain cell. The explanation of the Pasteur reaction on the basis of permeability or the colloidal state of the cell is fascinating, but in the absence of more concrete experimental evidence, it still remains to be hypothetical. According to Kimura (1940, 1941), Dixon's hypothesis, as it stands, can not be confirmed.

It must be understood that the relation between the respiration and the Pasteur reaction has not yet been defined clearly. Though the Pasteur reaction is closely associated with the respiration, it has been repeatedly pointed out that there is a clear distinction between these two oxidative processes. They are both connected with the cell structure, but the Pasteur reaction is far more sensitive to the destruction of the cell structure than the respiration, and rapidly disappears under the experimental condition *in vitro*. This is the reason why the Pasteur reaction scarcely manifests itself in tissue-brei or in tissue extracts. Another distinction can be noticed in the effect of poisons upon these reactions. Warburg (1926) found that the Pasteur reaction was completely inhibited by ethylisocyanide, while the respiration survived the action of the poison. The following substances were found to have an effect similar to that of ethylisocyanide: Hydrogen cyanide by Genevois (1927) and Laser (1935), carbon monoxide by Laser (1937 ii), phenylhydrazine by Dickens (1934), guanidine by Mendel (1932)

and Dickens (1939). The problem must depend on the further elucidation of the underlying fundamental reactions of the Pasteur effect.

The literatures on the Pasteur reaction, so far reviewed here, show that all the hypotheses available at present are not enough to explain the whole mechanism of the reaction. In most of the experiments conducted in the past, the determination has been limited to the magnitude of respiration and to the quantities of lactic acid and of a few other substances produced. Dixon (1936 ii) stated that the decrease in the products of anaerobic glycolysis was less characteristic than the decrease in carbohydrate catabolism in defining the Pasteur reaction, since the former reaction might necessarily be involved in the latter. However, considering the fact that carbohydrate is broken down into lactic acid through numerous intermediate stages, there is no direct, and quantitative relation between the breakdown of carbohydrate and the Pasteur reaction. Whatever the points of view may be, these hypotheses are always shrouded with ambiguity, so long as they are based on experimental data which have been obtained within such limited scopes. It occurred to us that simultaneous studies of the Pasteur reaction from the standpoints of both aerobic and anaerobic glycolysis might throw some light to this perplexing problem. Thus, in view of the clearness with which each phase of the anaerobic glycolysis in muscle has been settled, the aerobic breakdown of all the possible glycolytic intermediates by the muscle tissue were compared with the anaerobic by determining every product of the reactions; that is, the quantity of lactic acid, of all the intermediary substances produced from the substrates, and of the substrates remaining, together with the volume of oxygen consumed.

It was at least expected to clear up to a certain extent, if not conclusively, whether the oxidation of carbohydrate takes place, throughout, aside from glycolysis, or both reactions proceed together to a certain stage where they part one with the other.

EXPERIMENTAL.

Preparation of the enzyme.

Muscle slices: Immediately after killing rabbits by bleeding, pieces of femoral muscles were separated, cooled with ice, and cut fine as quickly as possible with cooled scissors. This operation finished within 5 minutes after the death of the animals.

Muscle extract: Fresh femoral muscles of rabbits were ground with a cooled meat-chopper, and mixed with an equal amount of cold water of 1°C. After standing for 30 minutes at 1°C., the extracts were centrifuged or filtered off through clothes. When necessary, the extracts were dialyzed through collodion membrane against running water for 7 hours at 8–10°C.

Experimental method.

Ten to twenty cc. of the fluid to be tested (without enzyme) were introduced into a modified Thunberg's evacuation tube which was provided with a side-chamber, and the tube was saturated with oxygen or with nitrogen gas which had been freed of oxygen by passing through red-heat copper spirals. The enzyme preparation which had been placed in the side-chamber, was brought into contact with the fluid, and the mixture was incubated at 37°C. After the lapse of a certain period of incubation, the mixture was deproteinized with an equal amount of 10% trichloroacetic acid solution. The detailed experimental conditions are shown in the corresponding tables.

Substrates.

Glycogen and glucose: the purest samples of Merck's product. **Lactic acid:** pure sodium or lithium salt. **Pyruvic acid:** sodium salt prepared by the method of Langenbeck et al. (1933). **Phosphoglyceric acid:** sodium salt prepared by the method of Vercellone and Neuberg (1935). **α -Glycerolphosphoric acid:** sodium salt derived from calcium glycerinum phosphoricum neutrale (Merck) which had been purified by the method of Meyerhof and Kiessling (1933). **Hexosediphosphoric acid:** sodium salt obtained from "candiolin" (Bayer) which had been purified by the method of Neuberg and Sabetay (1925). **Fructose-6-phos-**

phoric acid: sodium salt prepared from candiolin by the Neuberg method (1918). Glucose-1-phosphoric acid: sodium salt prepared by the Kiessling method (1938). Adenosinetriphosphoric acid: samples prepared by the Barrenscheen and Filz method (1932). Adenylic acid: Henning's preparation and samples prepared by the Ostern method (1932). Hexokinase: samples prepared by the Meyerhof method (1927) and by the method of Willstätter and Rohdewald (1940). Cozymase: samples prepared by the Meyerhof and Ohlmeyer method (1937). The synthesis of phosphopyruvic acid ended in failure.

Measuring method.

Lactic acid: Friedemann, Cotonio and Shaffer (1927). Glucose and reducing substances: Hanes (1929). Glycogen: Good, Kramer and Somogyi (1933). Pyruvic acid: Clift and Cook (1932). Phosphoric acid: Teorell (1931). Acid-hydrolysis of hexosephosphates: Lohmann (1928). Triosephosphate: Meyerhof and Lohmann (1934). Phosphopyruvic acid: Lohmann and Meyerhof (1934). Phosphoglyceric acid: Rapoport (1937) or Meyerhof and Schulz (1938). Glycerolphosphoric acid: Meyerhof and Kiessling (l. c.). Owing to the low reliability of the last five methods, the determination of hexosephosphates and other phosphorylated substances cannot be accurate.

Consumption of oxygen: 0.5 gm. of muscle slices and 2.0 cc. of the buffer solution were placed in the main chamber of Warburg's manometer, 0.5 cc. of the substrate solution in the side chamber, and a piece of filter paper which soaked up 2 cc. of 20% potassium hydroxide solution in the additional chamber. When muscle extract was used instead of slices, 1.5 cc. of the extract and 1.7 cc. of the phosphate buffer solution (containing 1.2 mg. of dichlorphenolindophenol) were placed in the main chamber. The readings were taken in the usual way.

I. EXPERIMENTS WITH MUSCLE SLICES.

A. *Lactic acid.*

For the inability of muscle slices to oxidize lactic acid and to

re-synthesize carbohydrate from lactic acid, the present experiments constituted an addition to a quantity of evidences which had already been accumulated by Meyerhof et al. (1925), Hahn et al. (1930), Kutscher and Sarreither (l. c.), and others. The experimental conditions were as follows: 4 gm. of muscle slices, 6 cc. of sodium lactate solution (end-concentration $M/50$), 2 cc. of 0.15M phosphate buffer (pH 7.4), and 13 cc. of 0.9% sodium chloride solution were incubated at 37°C. for various lengths of time under an aerobic and anaerobic condition. There was no increase of oxygen uptake, glycogen, and reducing substances in the presence of lactate. Protocols are omitted.

As to the consumption of oxygen in the presence of lactic acid and other substances, Chapter III is to be referred to.

B. Pyruvic acid.

The result of an experiment is listed in Table I. It will be noticed here that each table in this paper shows the result of an experiment as the representative of at least five experiments which gave approximately the same results, although quantitatively they varied somewhat with different preparations of the enzyme. The addition of pyruvic acid increased the production of lactic acid, but

TABLE I.

Production of Lactic Acid from Pyruvic Acid.

10 cc. of 0.1 M sodium pyruvate solution + 7 gm. of muscle slices + 5 cc. of 2.6% NaHCO₃ solution + 20 cc. of 0.9% NaCl solution. 120 minutes. 37°C.

Control: 10 cc. of 0.9% NaCl solution instead of pyruvate solution.

Time of incubation (min.)	Main experiment			Control	
	0	120		120	
Atmosphere		N ₂	O ₂	N ₂	O ₂
Pyruvic acid (mg.)	88.5	70.4	61.6	0.24	0.20
Lactic acid (mg.)	60.1	116.5	112.1	105.4	98.8
Inorg. P (mg.)	10.4	11.8	11.9	11.7	11.7
Glycogen (mg.)	15.7	8.6	9.1	3.2	4.0
Fermentable sugar (mg.)	21.0	23.9	25.7	24.8	26.0

there was no noticeable difference in the quantities of the latter acid produced in the presence and absence of oxygen. No definite information was obtained of the re-synthesis of carbohydrate. The most notable difference observed was the far more distinct decrease of pyruvic acid under the aerobic condition than the anaerobic. The fate of this pyruvic acid consumed is quite obscure. It was not possible to examine whether the aerobic disappearance of the acid was followed by the increased consumption of oxygen, since pyruvic acid exerted a depressing effect on the oxygen uptake. Whatever the situation may be, the aerobic consumption of the acid seems, so far as the production of lactic acid is concerned under the conditions of the present experiment, to have no close connection with the Pasteur reaction. The problem will be discussed in detail in Chapter IV.

C. Phosphoglyceric acid.

The difference in the quantity of lactic acid which was produced from phosphoglyceric acid under an aerobic and anaerobic

TABLE II.

Formation of Lactic Acid from Phosphoglyceric Acid.

5 cc. of 0.1 M sodium phosphoglycerate solution + 4 gm. of muscle slices + 2 cc. of 2.6% NaHCO_3 solution + 8 cc. of 0.9% NaCl solution.

10 and 60 minutes. 37°C.

Control: 5 cc. of NaCl solution instead of the substrate solution.

Time of incubation (min.)	Main experiment					Control	
	0	10		60		60	
Atmosphere		N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂
Lactic acid (mg.)	15.4	23.4	21.5	33.3	31.7	21.2	19.7
Phosphoglyceric acid (mg.)	86.0	±	±	±	±		
Pyruvic acid* (mg.)	0.2	28.8	25.7	33.2	32.4	0.9	0.4
Phosphopyruvic acid (mg.)	0	0.4	0.4	0.3	0.3		
Inorg. P (mg.)	4.6	16.2	14.5	20.6	20.1	6.4	6.8
Difficently hydrolysable P (mg.)	15.6	3.4	4.6	1.2	1.4		
Total P (mg.)	22.1						

* Pyruvic acid + phosphopyruvic acid.

condition was not striking, though the amount of the acid was slightly less under the former condition (Table II). The absolute amount of lactic acid produced was small. It will be noticed in the table that phosphoglyceric acid was decomposed very rapidly by the muscle enzyme and there was produced a large quantity of pyruvic acid. Phosphoglyceric acid was decomposed a little more markedly in the absence of oxygen than in its presence; the production of pyruvic acid and inorganic phosphate was always slightly larger under the anaerobic condition. However, the difference was too small to account for the Pasteur reaction.

D. α -Glycerolphosphoric acid.

It is shown in Table III that, here again as in the case of phosphoglyceric acid, oxygen exerted an inhibiting effect, though only to a slight extent, on the production of lactic acid from α -glycerolphosphoric acid, and that the production of the acid was quite small. It is to be noted that there was a considerable uptake of oxygen in aerobiosis (see Chapter III).

TABLE III.

Formation of Lactic Acid from α -Glycerolphosphoric Acid.

6 cc. of 0.08 M sodium α -glycerolphosphate solution + 4 gm. of muscle slices +
2 cc. of 0.15 M phosphate buffer (pH 7.4) + 13 cc. of 0.9% NaCl solution.
60 minutes. 37°C.

Control: 6 cc. of NaCl solution instead of the substrate solution.

	Main experiment		Control	
	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂
Lactic acid (mg.)	33.9	30.9	30.1	26.3
Free P (mg.)	38.1	37.6	36.1	34.5

Lactic acid at 0 time: 14.5 mg.

Inorganic P at 0 time: 4.6 mg.

E. Hexosediphosphoric acid or triosemonophosphoric acid.

The use of either hexosediphosphate or triosephosphate brings about the same result, as a part of the former is rapidly converted

TABLE IV.

Formation of Lactic Acid from Fructosediphosphate.

10 cc. of 0.1 M sodium fructosediphosphate solution + 4 gm. of muscle slices + 1 cc. of 0.15 M phosphate buffer (pH 7.4) + 9 cc. of 0.9% NaCl solution. 37°C.

Control: 10 cc. of NaCl solution instead of the substrate solution.

Time of incubation (min.)	Main experiment			Control	
	0	60		60	
Atmosphere		N ₂	O ₂	N ₂	O ₂
Lactic acid (mg.)	17.2	60.5	56.3	28.2	21.0
Triosephosphate P (mg.)	±	3.7	4.8	0.2	0.3
Glycerolphosphoric acid (mg.)	—	9.2	3.0	—	—
Phosphoglyceric acid (mg.)	1.1	6.4	6.7	—	—
Bisulfite binding subst. in terms of pyruvic acid (mg.)	0.7	20.0	17.0	0.4	0.3
Inorg. P (mg.)	5.8	23.4	18.5	7.1	6.5
180-min. P (mg.)	—	22.8	30.8	0.2	1.4
Difficultly hydrolysable P (mg.)	—	7.0	2.9	0.8	0.3

into the latter by aldolase present in muscle slices. As shown in Table IV, the production of lactic and pyruvic acid was slightly inhibited by oxygen. The amount of lactic acid produced from the Harden-Young ester was larger than from either phosphoglyceric acid or glycerolphosphoric acid, but was smaller than from either hexosemonophosphates or glycogen. Inorganic phosphate was present in a larger amount in the absence of oxygen, indicating that the disintegration of the Harden-Young ester was more profound in anaerobiosis. There was no noticeable difference in the quantity of phosphoglyceric acid produced under both conditions. The presence of a larger amount of the difficultly hydrolysable phosphate fraction in the absence of oxygen may be attributed to the accumulation of glycerolphosphate which is easily oxidized under the aerobic condition. As a matter of fact, the amount of glycerolphosphate was larger in anaerobiosis than in aerobiosis. That an exceedingly larger amount of the 180-minute hydrolysable phosphate fraction was present in aerobiosis is another sign of the inhibition of the degradation of the ester in the presence of oxygen.

F. Triosephosphoric acid + pyruvic acid.

According to Meyerhof, the dismutation between triosephosphoric acid and pyruvic acid into phosphoglyceric acid and lactic acid respectively constitutes the main process of glycolysis. Table V reveals that the production of lactic acid in this reaction was rather marked, but that its difference in the presence and absence of oxygen was quite small.

TABLE V.

Production of Lactic Acid from Fructosediphosphate in the Presence of Pyruvate.

120 minutes. 37°C.

		Main experiment		Control I		Control II		Control III	
0.1 M sodium fructosediphosphate		2 cc.		2 cc.		—		—	
0.2 M sodium pyruvate		2 cc.		—		2 cc.		—	
Muscle slices		4 gm.		4 gm.		4 gm.		4 gm.	
Phosphate buffer (pH 7.4)		3 cc.		3 cc.		3 cc.		3 cc.	
2.6% NaHCO ₃		2 cc.		2 cc.		2 cc.		2 cc.	
0.85% NaCl		10 cc.		12 cc.		12 cc.		14 cc.	
Atmosphere		N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂
Lactic acid	Found(mg.)	55.6	50.4	46.6	38.1	27.6	26.0	26.2	22.6
	Difference(mg.)	5.2		8.5		1.6		3.6	

Lactic acid at 0 time: 10.8 mg.

G. Hexose-6-phosphoric acids.

The use of either glucosephosphoric acid or fructosephosphoric acid results in the same, since phosphosaccharomutase of Iri (1938), which is present in muscle, converts one of the acids into the other and immediately establishes an equilibrium between them. In the present experiment, Neuberg's fructose-6-phosphoric acid was used as the substrate. The results are listed in Table VI, in which the following two points are noticeable; the first is the high production of lactic acid, and the second is the remarkable drop in the

TABLE VI.

Production of Lactic Acid from Fructosemonophosphate.

10 cc. of 0.1 M sodium fructosemonophosphate + 4 gm. of muscle slices + 7 cc. of 0.15 M phosphate buffer solution (pH 7.4) + 3 cc. of 0.9% NaCl solution.
60 minutes. 37°C.

Control: 10 cc. of NaCl solution instead of the substrate solution.

Lactic acid	Main experiment		Control	
	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂
Found (mg.)	96.4	76.9	33.4	28.0
Difference (mg.)	19.5		5.4	

Lactic acid at 0 time: 12.0 mg.

production of lactic acid in the presence of oxygen, that is, the occurrence of the Pasteur reaction. Considering the fact that the Pasteur reaction is indistinct in hexosediphosphate, it is conceivable that the fall in the decomposition of hexosemonophosphates in aerobiosis might be brought about by the inhibition of the conversion of fructosemonophosphate into fructosediphosphate.

TABLE VII.

Production of Lactic Acid from Glucose-1-Phosphate.

10 cc. of 0.1 M sodium glucosephosphate + 4 gm. of muscle slices + 5 cc. of 0.15 M phosphate buffer (pH 7.4) + 6 cc. of 0.9% NaCl solution.
60 minutes. 37°C.

Control: 10 cc. of NaCl solution instead of the substrate solution.

		Main experiment		Control	
		N ₂	O ₂	N ₂	O ₂
Lactic acid	Found (mg.)	85.2	61.5	39.4	32.1
	Difference (mg.)	23.7		7.3	
Inorg. P (mg.)		33.9	20.1	37.6	35.2
10-min. P (mg.)		11.4	14.4	0.1	1.3
180-min. P (mg.)		14.7	19.3	0.3	1.1
Difficultly hydrolysable P (mg.)		13.7	9.2	2.4	2.8
Total P (mg.)		73.7	73.0	40.4	40.4

TABLE VIII.

Formation of Lactic Acid from Glycogen.

6 cc. of 2.5% glycogen solution + 4 gm. of muscle slices + 8 cc. of 0.15 M phosphat buffer
(pH 7.4) + 6 cc. of 0.9% NaCl solution, 37°C.

(control: 6 cc. of NaCl solution instead of the substrate solution.)

Time of incubation (min.)	Atmosphere	Main experiment						Control			
		0		60		120		0		60	
				N ₂	O ₂	N ₂	O ₂			N ₂	O ₂
	Lactic acid (mg.)	16.8		57.2	35.2	83.5	39.0	16.1		24.6	22.5
	Glycogen (mg.)	159.8		69.5	85.4	12.6	56.8	8.6		1.9	1.4
	Aldose in terms of glucose (mg.)	17.1		38.4	37.7	39.6	37.9	—		—	—
	Reducing substance in terms of glucose (mg.)	12.6		30.8	35.5	39.4	47.1	—		—	—
	Glycerolphosphoric acid (mg.)	—		6.3	1.5	—	—	—		—	—
	Phosphoglyceric acid (mg.)	—		3.8	4.6	—	—	—		0.5	0.6
	Bisulfite binding substance in terms of pyruvic acid (mg.)	—		6.6	5.7	—	—	—		0.1	0.1
	Inorg. P (mg.)	—		40.3	39.9	41.1	40.0	—		—	—
	Triosephosphate P (mg.)	—		1.2	1.5	—	—	—		0.2	0.3
	180-min. P (mg.)	—		7.3	8.3	—	—	—		0.8	1.5
	Difficultly hydrolysable P (mg.)	—		1.9	1.6	—	—	—		0.5	0.8

H. Glucose-1-phosphoric acid.

The Pasteur reaction was marked (Table VII). The ester behaved in a similar way to hexose-6-phosphates. This seems to indicate that the reaction, glucose-1-phosphate $\rightarrow$ glucose-6-phosphate, is not affected by oxygen. The analysis of the phosphate fractions (inorganic phosphate, 10-minute hydrolysable phosphate, 180-minute hydrolysable phosphate, and difficultly hydrolysable phosphate) revealed that the effect of oxygen on the fractions was not distinct enough to place any particular significance in the difference in their quantity.

I. Glycogen.

Table VIII presents an additional fact to the well-known evidence that the Pasteur reaction takes place distinctly in the case of glycogen. It is to be pointed out that a large quantity of glycogen remained under the aerobic condition. The difference in the quantities of glycogen, which became more marked with time,

TABLE IX.

Effect of Potassium Chloride on Production of Lactic Acid from Glycogen.

90 min. 37°C.

		Experiment					
		I		II		III	
2% Glycogen		—		5 cc.		5 cc.	
Muscle slices		4 gm.		4 gm.		4 gm.	
0.15 M phosphate buffer (pH 7.2)		2 cc.		2 cc.		2 cc.	
0.15 M NaCl		13 cc.		8 cc.		—	
0.15 M KCl		—		—		8 cc.	
Atmosphere		N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂
Glycogen (mg.)		5.6	6.7	77.1	97.8	77.2	85.4
Lactic acid	Found (mg.)	20.7	13.4	40.9	15.7	41.7	28.2
	Difference(mg.)	7.3		25.2		13.5	

Lactic acid at 0 time: 12.3 mg.

Glycogen at 0 time: 10.7 mg. in Experiment I, 111.7 mg. in II and III.

covered $\frac{5}{6}$ – $\frac{3}{4}$ of the difference in the amount of lactic acid produced. This seems to show that the retarding effect of oxygen on glycolysis manifested itself already at a very early stage of the reaction by inhibiting the phosphorolysis of glycogen. Inorganic phosphate, phosphoglyceric acid, and pyruvic acid did not show any significant change. There was also no marked difference in the production of reducing substances and aldose under either condition. Owing to its ready oxidability, glycerolphosphoric acid was found in far less quantity in the presence of oxygen. The inhibitory effect of potassium on the Pasteur reaction was also observable in glycolysis of muscle slices as in the case of other tissues (Table IX).

J. Glucose and hexokinase.

The production of lactic acid from glucose by the action of

TABLE X.

Production of Lactic Acid from Glucose in the Presence of Hexokinase.

	Main experiment			Control I			Control II		
Glucose	2 cc. (90 mg.)			—			—		
Glycogen	—			2 cc. (83 mg.)			—		
Hexokinase	5 cc.			—			—		
Muscle slices	4 gm.			4 gm.			4 gm.		
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	1 cc. (53 mg.)			1 cc.			1 cc.		
1.3% NaHCO ₃	2 cc.			2 cc.			2 cc.		
0.9% NaCl	10 cc.			15 cc.			17 cc.		
Time of incubation at 23°C. (min.)	0		60	0		60	0		60
Atmosphere		N ₂	O ₂		N ₂	O ₂		N ₂	O ₂
Lactic acid (mg.)	20.1	73.7	69.4	16.5	45.0	29.2	16.6	19.9	17.2
Inorg. P (mg.)	19.2	9.0	7.3	10.1	8.1	7.2	10.2	10.7	10.4
7-min. P (mg.)	1.3	4.9	4.9	1.2	2.0	2.2	1.0	0.5	1.0
180-min. P— 7-min. P (mg.)	0.4	2.9	5.4	0.3	1.0	1.9	0.3	0.1	0.1
Difficultly hydrolysable P (mg.)	0.7	4.8	4.0	0.7	1.1	0.8	0.7	1.0	0.8
Total P (mg.)	21.6	21.6	21.6	12.3	12.2	12.1	12.2	12.3	12.3
Reducing substance in terms of glucose (mg.)	102.4	61.7	65.7						

muscle slices was greatly increased by adding hexokinase and inorganic phosphate, particularly in aerobiosis. It is shown in Table X that the difference in the quantity of the acid in the presence and absence of oxygen was exceedingly small compared to glycogen, that is, the Pasteur reaction was not distinct. There was no great difference in the glucose consumption between the aerobic and anaerobic condition. The esterification of inorganic phosphate and the production of the 180-minute hydrolyzable phosphate fraction were slightly larger in the presence of oxygen. Willstätter and Rohdewald (l. c.) stated that oxygen did not have any noticeable effect on the production of lactic acid from glucose by the fresh muscle tissue in the presence of hexokinase. Now, a question was raised why the Pasteur reaction was more distinct in glycogen than in glucose with hexokinase. It was found that the Pasteur reaction was also inhibited when hexokinase was added to glycogen (Table XI). It seemed that there was present in the hexokinase preparation some substance which accelerated the aerobic and anaerobic glycolysis, especially the former, thus causing the inhibition of the Pasteur reaction.

TABLE XI.

Production of Lactic Acid from Glycogen in the Presence of Hexokinase.

2.5 cc. of 3% glycogen solution + 4 gm. of muscle slices + 3 cc. of hexokinase solution + 2.5 cc. of 0.15 M phosphate buffer (pH 7.4) + 5 cc. of 0.15 M NaCl solution. 45 min. 37°C.

Control: 5 cc. of NaCl solution instead of the substrate solution.

Lactic acid	Main experiment		Control	
	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂
Found (mg.)	62.7	61.9	52.1	41.7
Difference (mg.)	0.8		10.4	

Lactic acid at 0 time: 14.9 mg. in main experiment,
13.0 mg. in control.

II. EXPERIMENTS WITH MUSCLE EXTRACT.

It is a well-known fact that the Pasteur reaction cannot be

TABLE XII.

Formation of Lactic Acid from Various Substrates by the Action of Muscle Extract.

5 cc. of 0.12 M solutions of substrates + 2.7 mg. of 2,6-dichlorophenolindophenol
+ 5 cc. of muscle extract (1:1) + 5 cc. of phosphate buffer (pH 7.4).
60 min. 37°C.

Control: 5 cc. of 0.9% NaCl solution instead of the substrate solutions.

Substrate	Lactic acid		
	Increased (mg.)		Difference (mg.)
	N ₂	O ₂	
Glycogen	13.5	4.5	9.0
Glucose-1-phosphate	13.4	3.6	9.8
Fructose-6-phosphate	13.7	4.6	9.1
Fructosediphosphate + pyruvic acid	10.9	9.9	1.0
Fructosediphosphate	3.7	2.6	1.1
Pyruvic acid	0.4	0.2	0.2
Control	1.2	0.9	0.3

Lactic acid at 0 time: 12.8 mg.

found in the muscle extract. Lipmann (1933) found, however, that 2,6-dichlorophenolindophenol inhibited reversibly the aerobic glycolysis of the Meyerhof extract of guinea pig muscle. According to his interpretation, the muscle extract lacks in the autoxydizable respiration-enzyme which retards the glycolysis under the aerobic condition, and the dye has a stimulating effect on this enzyme. With the use of the muscle extract and 2,6-dichlorophenolindophenol, the aerobic and anaerobic production of lactic acid from glycogen and from various intermediary products of glycolysis was examined in the present experiment. The Pasteur reaction took place most distinctly at the concentration of the dye which was decolorized within 10 to 20 minutes at 37°C. under the experimental condition. The decoloration was accelerated by the addition of glycogen, hexosediphosphate, adenosinetriphosphate, and other substances. The brief summary of the experimental results are listed in Table XII. The detailed analysis of the reaction was done with glycogen, and the results are shown in Table XIII. It will be

TABLE XIII.

Production of Lactic Acid from Glycogen (Muscle Extract).

200 mg. of glycogen + 8 cc. of muscle extract (1:1) + 2.9 mg. of dichlorophenolindophenol + 8 cc. of 0.2 M phosphate buffer. 37°C.

Time of incubation (min.)	0	35		55	
Atmosphere		N ₂	O ₂	N ₂	O ₂
Lactic acid (mg.)	17.5	37.6	29.9	51.7	37.4
Glycogen (mg.)	203.9	26.6	49.5	20.9	21.2
Reducing power in terms of glucose (mg.)	10.7	101.3	80.3	92.1	128.2
Aldose in terms of glucose (mg.)	15.3	86.7	74.0	72.4	125.6
Free P (mg.)	76.9	19.9	27.3	22.8	30.6
-180-min. P (mg.)	0.4	32.4	24.6	31.5	12.8
Difficultly hydrolysable P (mg.)	0.7	19.1	19.5	16.7	26.6

noticed in Table XII that there was a close similarity between muscle extracts and slices in their action on the production of lactic acid from various substrates under aerobic and anaerobic conditions. The Pasteur reaction and the production of the acid were marked in glycogen and hexosemonophosphates, while both reactions were very slight in other substrates. Considering these results obtained with muscle extracts, it can now be said that the poor production of lactic acid from fructosediphosphate and other substrates is not due to the low permeability of these substances through the cell membrane, but due to the fact that the substances can only produce the acid in a small quantity under the present experimental conditions. Table XIII shows that the difference in the quantity of the intermediary products in the presence and absence of oxygen was brought about more distinctly in extracts than in slices. Before entering into the discussion of the results, the following findings are to be recalled here. The conversion of the Robison ester into fructosediphosphate is retarded in the presence of oxygen; glycerolphosphate is rapidly removed in aerobiosis; phosphoglyceric acid is converted into phosphopyruvic or pyruvic acid with a great ease. Taking these points into consideration, the results of the present experiment may be interpreted in

the following way. In the early stage of the reaction, the consumption of glycogen, the decrease of inorganic phosphate, and the formation of the reaction products (lactic acid, reducing substances, and aldose) were greater under the anaerobic condition. This indicates that oxygen had a marked inhibitory effect on phosphorylation and on the subsequent degradation of glycogen. In the later stage, the difference in the amount of the glycogen consumed disappeared, and there was accumulated large quantities of reducing substances and of aldose under the aerobic condition, the difference in the amounts of lactic acid continuing to be distinct. The esterification of inorganic phosphate and the formation of the 180-minute hydrolysable phosphate fraction were always more marked in the absence of oxygen, while the difficultly hydrolysable fraction was formed in a larger amount in its presence. These results showed that the aerobic diminution in the production of lactic acid in the later stage is a result of cessation of the reaction which involved the phosphorylation of hexosemonophosphate. The accumulation of reducing substances, aldose, and the difficultly hydrolysable phosphate, reveals that the chiefly accumulated product was glucosemonophosphate which was in equilibrium with fructosemonophosphate. That the esterification of inorganic phosphate and the formation of the 180-minute hydrolysable phosphate fraction were higher in anaerobiosis means that glycogen was decomposed at a greater velocity and to a further extent under the anaerobic condition than in the aerobic.

III. CONSUMPTION OF OXYGEN.

It will be noticed, beforehand, that the output of carbon dioxide was not measured in the present experiments. Therefore, the consumption of oxygen does not necessarily mean respiration.

There was a seasonal variation in the consumption of oxygen by muscle slices of rabbits. The volume of oxygen consumed by 1 gm. of muscle slices at 37°C. was 50 cmm. after 30 minutes, and 100 cmm. after 60 minutes, in March; 32 cmm. and 54 cmm. in June; 15 cmm. and 20 cmm., in August and September. This seasonal variation can be traced to the difference in the carbohydrate content

of the winter and summer muscles. The addition of glycogen or hexosediphosphate to the winter muscle did not exert any noticeably increasing effect on the consumption of oxygen, while it raised the oxygen uptake of the summer muscle up to the level of the winter muscle. Both winter and summer muscles responded to the addition of glycogen by showing the Pasteur reaction to the same intensity, whilst hexosediphosphate was capable of bringing about the Pasteur reaction only to a slight extent in muscles of both kinds.

The consumption of oxygen was influenced in various ways by the addition of glycolytic products. Lactate retarded the oxygen uptake to a slight extent. Pyruvic acid exerted a strong lowering effect on the oxygen uptake, especially at the concentration higher than 0.01 M. Under this circumstance the consumption of oxygen in the presence of pyruvic acid could not be determined with accuracy. According to Krebs and Eggleston (l.c.), the added pyruvic acid competes for oxygen with the substrates normally present and suppresses their oxidation. Phosphoglyceric acid inhibited slightly the consumption of oxygen. This may be due to the action of pyruvic acid formed from the substrate. In the presence of α -glycerolphosphoric acid, a good deal of oxygen was consumed, while the Pasteur reaction was negligible. As has been mentioned above the Pasteur reaction was obscure in spite of large oxygen consumption in the case of fructosediphosphate. Hexosemonophosphates consumed more oxygen than glycogen, with same degree of the Pasteur reaction. These results present examples of the lack of quantitative relation between the oxygen uptake and the Pasteur reaction. All of the data mentioned above are represented graphically in Fig. 1.

The addition of adenosinetriphosphate to muscle slices increased the consumption of oxygen in the case of glycogen, hexosemonophosphates, and hexosediphosphate (Fig. 2). The inhibitory effect of adenosinetriphosphate on the oxygen uptake in control experiments which were run without adding substrates, may be attributed to the rapid disappearance of the preformed carbohydrate, which was easily oxidizable in the presence of

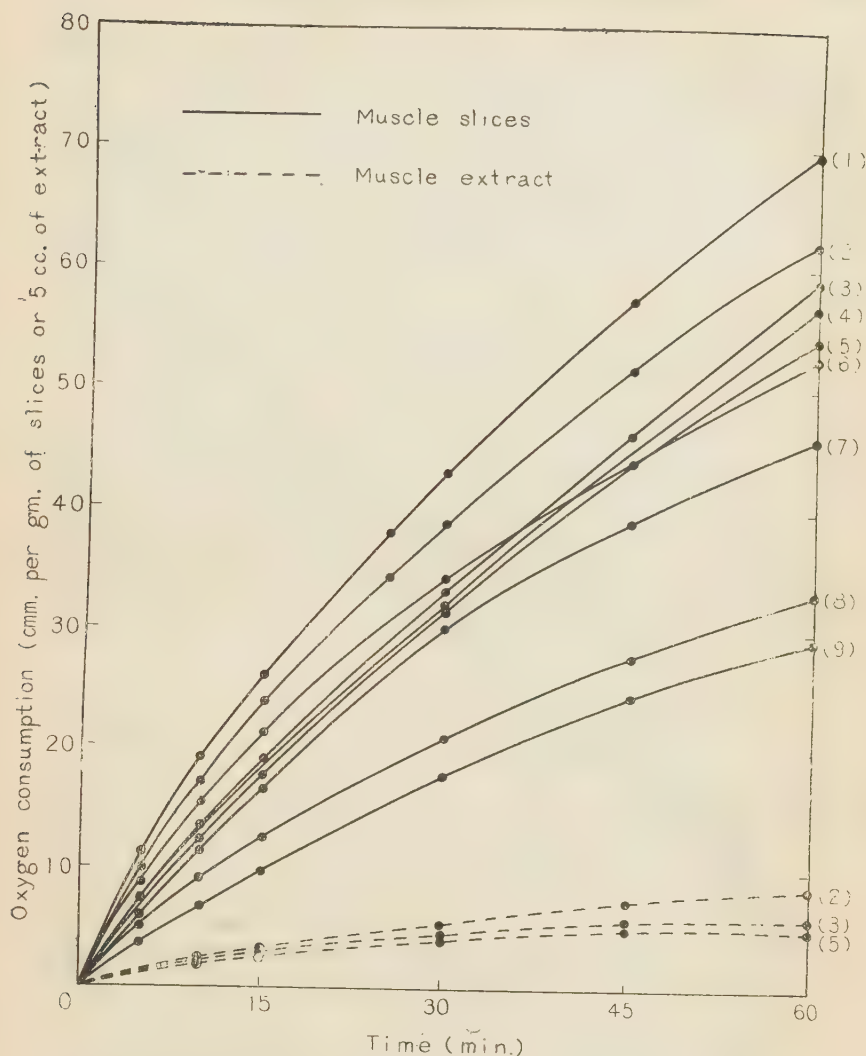


Fig. 1.

Oxygen Consumption.

In main room:

0.5 gm. of muscle slices + 1.0 cc. of phosphate buffer (pH 7.4) + 1.0 cc. of 0.9% NaCl solution; or 1.5 cc. of muscle extract (1:1) + 1.7 cc. of buffer + 1.2 mg. of dichlorophenolindophenol.

In side room:

0.5 cc. of 0.24 M solution of substrates.

37°C.

- 1) Glucose-1-phosphoric acid. 2) Fructose-6-phosphoric acid. 3) Glycogen.
 4) Fructosediphosphoric acid. 5) Control (without substrate). 6) Glycerol-phosphoric acid. 7) Lactic acid. 8) Phosphoglyceric acid. 9) Pyruvic acid.

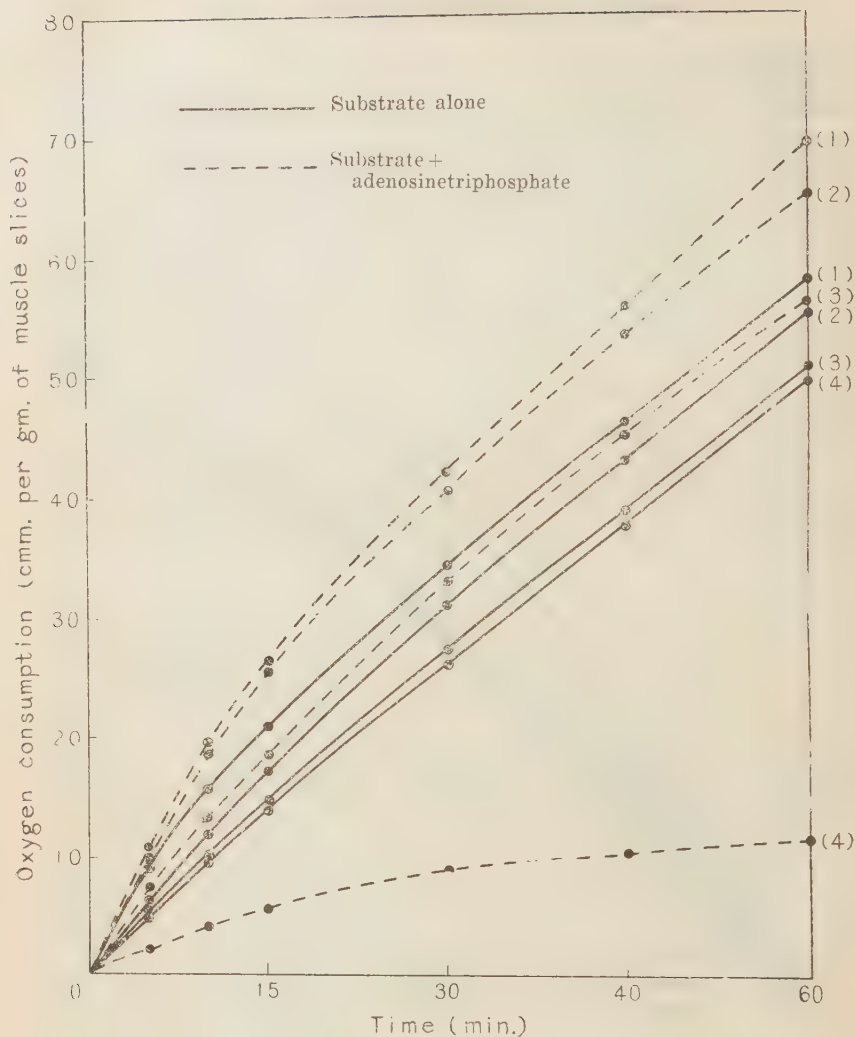


Fig. 2.

Oxygen Consumption in the Presence of Adenosinetriphosphate.

In main room:

0.5 gm. of muscle slices + 1.5 cc. of phosphate buffer (pH 7.4) + 0.5 cc. of 0.9% NaCl solution.

In side room:

0.3 cc. of 0.24 M solutions of substrates + 0.2 cc. of 0.25 M sodium adenosine-triphosphate.

37°C.

Control: 0.2 cc. of 0.9% NaCl solution instead of the substrate solutions.

1) Fructose-6-phosphate.

2) Glycogen.

3) Fructosediphosphate.

4) Control.

adenosinetriphosphate.

The consumption of oxygen in muscle extracts was exceedingly small (Fig. 1). Nevertheless, the Pasteur reaction was distinct. This finding also suggests that the oxygen uptake has no direct bearing upon the Pasteur reaction, though consideration must be given to the possibility that the presence of the dye may seriously influence the consumption of oxygen.

IV. EFFECT OF THE SUBSTANCES OF THE ADENYLIC ACID SYSTEM ON THE PASTEUR REACTION.

Reviewing the data so far obtained in the present experiments, the chief cause of the Pasteur reaction can probably be traced to the following two points: 1) The retardation of phosphorolysis of glycogen; 2) the inhibition of the formation of fructosediphosphate from fructosemonophosphate. It is a well-known fact that, among the glycolytic reactions, these two reactions which are inhibited by oxygen, require the co-enzymes of the adenylic acid system.

TABLE XIV.

Effect of Adenosinetriphosphate on the Production of Lactic Acid from Various Substrates (Muscle Slices).

Main experiment:

3 cc. of 5% glycogen solution or 3 cc. of 0.5 M solutions of hexosephosphates + 2 cc. of 0.1 M sodium adenosinetriphosphate + 2 gm. of muscle slices + 7 cc. of phosphate buffer (pH 7.4). 45 minutes. 37°C.

Control I: Without adenosinetriphosphate.

Control II: Without substrates.

Control III: Without adenosinetriphosphate and substrates.

		Lactic acid (mg.)							
		Main experiment		Control I		Control II		Control III	
Atmosphere		N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂
Substrate	Glycogen	45.6	49.2	42.5	34.3	10.4	9.8	9.8	8.2
	Fructose-6-phosphate	34.2	34.3	29.9	24.4				
	Fructosediphosphate	21.5	20.0	20.6	18.0				

From this evidence, the experiments were initiated to examine the effect of the substances of the adenylic acid system on the Pasteur reaction. It was expected that the reaction would be influenced by the addition of the substances. Table XIV shows that the expectation was fulfilled in muscle slices. The formation of lactic acid from glycogen and Neuberg's ester was increased by the addition of adenosinetriphosphate under the aerobic and anaerobic condition, particularly under the former, and thus the Pasteur reaction was profoundly retarded. The aerobic production of lactic acid often exceeded the anaerobic in the presence of a sufficient quantity of adenosinetriphosphate. The effect of adenosinetriphosphate on the production of lactic acid from fructosediphosphate was negligible. The effect of adenosinetriphosphate was demonstrated more clearly in the muscle extracts, especially in the extracts which had been deprived of the ability of glycolysis as well as the decoloration of dichlorphenolindophenol by dialyzing off the co-enzymes. The results are summarized in Table XV. The dialyzed extracts acquired the ability of glycolysis

TABLE XV.

Effect of Adenosinetriphosphate on the Production of Lactic Acid from Glycogen (Muscle Extract).

Experiment I.

220 mg. of glycogen + 2 cc. of 0.15 M sodium adenosinetriphosphate + 2.7 mg. of dichlorphenolindophenol + 5 cc. of muscle extract (1:1) + 8 cc. of 0.15 M phosphate buffer (pH 7.4). 45 minutes. 37°C.

Control: 2 cc. of water instead of adenosinetriphosphate solution.

Experiment II.

A. 220 mg. of glycogen + 3 cc. of sodium adenosinetriphosphate (5 mg.) + 1.45 mg. of dichlorphenolindophenol + 6 cc. of dialyzed muscle extract + 15 mg. of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 6 cc. of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4). 45 minutes. 37°C.

B. 50 mg. of sodium adenosinetriphosphate.

	Experiment I				Experiment II			
	Main experiment		Control		A		B	
Atmosphere	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂
Lactic acid (mg.)	23.5	24.6	23.5	14.4	19.4	13.0	30.4	29.2

on the addition of adenosinetriphosphate, and this was more marked in the case of a large quantity of the substance.

Adenosinetriphosphate showed no effect on the Pasteur reaction in brain slices of rabbits and in yeast.

The effect of muscle adenylic acid on glycolysis and on the Pasteur reaction of muscle slices and extracts was of the same quality as that of adenosinetriphosphate, but it was less constant and less distinct. The results of the experiments with slices and extracts are briefly presented in Table XVI.

TABLE XVI.

Effect of Adenylic Acid on the Production of Lactic Acid from Glycogen.

Experiment I.

80 mg. of glycogen + 2 cc. of sodium adenylate (24 mg.) + 1 gm. of muscle slices + 2 cc. of 0.15 M phosphate buffer (pH 7.4) + 1 cc. of 0.9% NaCl solution. 60 minutes. 37°C.

Control: 2 cc. of NaCl solution instead of adenylate solution.

Experiment II.

160 mg. of glycogen + 2 cc. of sodium adenylate (16 mg.) + 0.37 mg. of di-chlorophenolindophenol + 6 cc. of dialyzed muscle extract + 4 cc. of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) + 15 mg. of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 7 cc. of water.

80 minutes. 37°C.

Control: 2 cc. of water instead of adenylate solution.

	Experiment I				Experiment II			
	Main experiment		Control		Main experiment		Control	
Atmosphere	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂
Lactic acid (mg.)	26.5	25.3	14.9	8.1	26.0	23.7	13.4	6.7

Co-enzyme, reduced glutathione, and creatine exerted no noticeable influence on the Pasteur reaction in muscle slices and extracts.

IV. DISCUSSION.

The present data do not permit a full analysis of the Pasteur reaction, but certain points deserve discussion. The most salient fact found was that phosphorylation of fructose-6-phosphate to

fructosediphosphate and phosphorolysis of glycogen were intensively retarded in the presence of oxygen. It can be said with a fair degree of certainty that the inhibitory effect of oxygen is mainly concentrated, at least under the conditions of the present experiment, on the two reactions mentioned above.

It has been often observed by many investigators that phosphorylation was more marked in the presence of oxygen than in its absence, and this has been interpreted as the result of the increased esterification in aerobiosis. The present data suggest, however, that the accumulation of the phosphorylated products may be the cause of this increased phosphorylation.

The glycolytic intermediates divide themselves into two groups with regard to the magnitude of the Pasteur reaction. Glycogen and hexosemonophosphates which produce a large amount of lactic acid under the anaerobic condition, give rise to the Pasteur reaction, while hexosediphosphate and other intermediates down to pyruvic acid produce lactic acid in a small quantity on the one hand, and give the Pasteur reaction, on the other hand, in a very indistinct way. This distinction between the two groups of substances raises a question whether the obscurity of the Pasteur reaction in hexosediphosphate and other substances is connected with the low production of lactic acid from these substrates. An attempt was made in the present experiment to increase the yield of lactic acid from fructosediphosphate by using a larger amount of the substrate and the enzyme, and by adding pyruvic acid to the substrate. These treatments did not, however, increase the magnitude of the Pasteur reaction at all. There is at present no satisfactory answer to this question. The small production of lactic acid from hexosediphosphate and other glycolytic intermediates may be due to the lack of the substances, which accelerate the reaction by coupling with the used substrates or with their degradation products. In view of the fact that the same distinction was also observed in the experiments with muscle extracts, it is clear that the distinction is not brought about by the lower permeability of hexosediphosphate and other substrates toward the cell membrane than in the case of glycogen and hexosemonophosphates.

The following two facts involve a suggestion concerning the nature of the Pasteur reaction in muscle: 1) Phosphorolysis of glycogen and the phosphorylation of fructosemonophosphate are the two reactions which need the co-enzyme of the adenylic acid system; 2) adenosinetriphosphate and adenylic acid have a strong, retarding action on the Pasteur reaction. It will be recalled in this connection that adenylic acid is promptly deaminized in the excised muscle. Between two co-enzymes of glycolysis, adenosinetriphosphate was found by Kobayasi (1940) to be decomposed more quickly than co-zymase. Then the quantity of the substances of the adenylic acid system may be different in intact and excised muscles, and this difference may have some effect, at least quantitatively, on glycolysis *in vivo* and *vitro*.

As far as the present experiment concerns, it may be said that the decomposition of carbohydrate proceeds along a definite path with no regard to the presence or absence of oxygen, and that the aerobic retardation of the intermediary reactions of glycolysis constitutes the main cause of the Pasteur reaction. This differs, it is to be noticed, from the hypotheses hitherto advanced that the oxidative removal of the glycolytic intermediates originates the Pasteur reaction. It has been described in the introductory part that the hypotheses of the third group postulate the retardation of glycolysis in the presence of oxygen as the cause of the Pasteur reaction. The glycolytic phases where the inhibition of oxygen has been assumed to take place, differs, however, from those in our hypothesis. The hypothesis which attracts the particular notice is that of Michaelis and Smythe who attributed the inhibitory effect of oxygen on yeast fermentation to the aerobic suppression of the formation of hexosediphosphate.

However, it is possible that the Pasteur reaction is, at least partly, attributable to the oxidative removal of the intermediary products of glycolysis. The great decrease in pyruvic acid and the high oxygen consumption of glycerolphosphoric acid under aerobic conditions of the present experiments deserve some comments in this connection. The present data afforded no indication that the oxidative removal of pyruvic acid caused the Pasteur reaction;

the production of lactic acid was not seriously influenced by oxygen. It must, however, be stated that the present experiments were run under a particular condition where a rather large quantity of pyruvic acid was added in one dose to the enzyme solution. Circumstances may be different in natural glycolysis. Here, pyruvic acid is produced continually in a small quantity. Then, the oxidation of pyruvic acid may participate in the Pasteur reaction under these conditions which are more physiological than those in the present experiments. The significance of the high oxygen uptake in glycerolphosphoric acid is not clear; but it can be said that the oxidation of the acid is not closely related to the Pasteur reaction, because there is no serious difference in the production of lactic acid from this acid under aerobic and anaerobic conditions on the one hand, and glycerolphosphoric acid is not involved in the main process of glycolysis on the other hand.

There was throughout the present experiments a tendency for the decomposition of every intermediate of glycolysis to be more or less retarded in the presence of oxygen. This retarding effect of oxygen may be accumulative until it turns out to be one of the causes of the Pasteur reaction.

It is to be noted that the occurrence of the Pasteur reaction or its magnitude cannot be determined from the quantity of the oxygen consumed, since there is no quantitative relation between the oxygen uptake and the Pasteur reaction.

Nothing conclusive can be found about the question as to whether oxygen exerts directly its inhibitory action on the enzyme system or indirectly by affecting co-enzymes or some side reactions. The fact that the substances of the adenylic acid system have a profound influence on the Pasteur reaction suggests the possible participation of the substances in the reaction. Lipmann (1933, 1934 i) stated that the inhibitory effect of oxidizing agents on fermentation of the maceration extract of yeast manifested itself first after all the sulfhydryl compounds of the extract had disappeared. In the present experiments, reduced glutathione did not protect anaerobic glycolysis from the inhibiting effect of oxygen.

SUMMARY.

1) The Pasteur reaction, in slices and extracts of rabbit muscle, was studied with the employment of glycogen, glucose+hexokinase, and all possible intermediary products of the anaerobic muscle glycolysis as the substrates of the reaction. The formation of both lactic acid and all other products, the consumption of the substrates, and the oxygen uptake were compared under aerobic and anaerobic conditions.

2) The Pasteur reaction was distinct when glycogen and hexosemonophosphates were treated with muscle slices, while the reaction was very slight or negligible in fructosediphosphate, triosephosphate, phosphoglyceric acid, α -glycerolphosphoric acid, pyruvic acid, and lactic acid.

3) The results obtained with the use of muscle extracts, in the presence of 2,6-dichlorophenolindophenol, were quite similar to those of muscle slices.

4) In the earlier stage of the lactic acid production from glycogen, there remained a larger quantity of glycogen unchanged in the presence of oxygen than in its absence. In the later stage, the Pasteur reaction was accompanied by the accumulation of the Robison ester fraction.

5) It was deduced from these findings that the cause of the Pasteur reaction in muscle could be mainly attributable to the retarding effect of oxygen on the following two reactions of glycolysis; Phosphorolysis of glycogen, and the conversion of fructosemonophosphate into fructose diphosphate. Thus, the Pasteur reaction is not caused by the oxidative removal of the glycolytic intermediates, but by the aerobic retardation of the production of the intermediates. This may suggest that the aerobic and anaerobic decomposition of carbohydrate might proceed along the same path.

6) The Pasteur reaction was markedly inhibited by the addition of adenosinetriphosphate and muscle adenylic acid to the reacting system.

7) The consumption of oxygen had no quantitative connection with the Pasteur reaction.

REFERENCES.

- Ashford, C. A. and Dixon, K. C. (1935): *Biochem. J.*, **29**, 157.
Barker, S. B., Shorr, E. and Malam, M. (1939): *J. Biol. Chem.*, **129**, 33.
Barrenscheen, H. K. and Filz, W. (1932): *Biochem. Z.*, **250**, 281.
Barron, E. S. G. (1929): *J. Biol. Chem.*, **81**, 445; **84**, 83.
Barron, E. S. G. and Harrop, G. A. (1928): *J. Biol. Chem.*, **79**, 65.
Barron, E. S. G. and Hoffman, L. A. (1929-30): *J. general Physiol.*, **13**, 483.
Bierich, R. and Rosenbohm, A. (1934): *Z. physiol. Chem.*, **223**, 136.
Boyland, E. and Boyland, M. E. (1935): *Biochem. J.*, **29**, 1910.
Bumm, E. and Appel, H. (1932): *Z. physiol. Chem.*, **210**, 79.
Bumm, E., Appel, H. and Fehrenbach, K. (1934): *Z. physiol. Chem.*, **223**, 207.
Chaix, P. and Fromageot, C. (1939): *Enzymologia*, **6**, 33.
Clift, F. P. and Cook, R. P. (1932): *Biochem. J.*, **26**, 1788.
Dickens, F. (1934): *Biochem. J.*, **28**, 537.
Dickens, F. (1935): *Nature*, **135**, 762.
Dickens, F. (1936): *Biochem. J.*, **30**, 1233.
Dickens, F. (1939): *Biochem. J.*, **33**, 2017.
Dickens, F. and Greville, G. D. (1935): *Biochem. J.*, **29**, 1468.
Dixon, K. C. (1936 i): *Nature*, **137**, 742.
Dixon, K. C. (1936 ii): *Biochem. J.*, **30**, 1479.
Dixon, K. C. and Holmes, E. (1935): *Nature*, **135**, 995.
Engelhardt, W. A. and Barchaseh, A. P. (1938): *Biochimija*, **3**, 500; *Chem. Zbl.*, I, 3197 (1939).
Euler, H. v. (1933): *Ark. Kem. Mineral. Geol.*, A **11**, 7; *Chem. Zbl.*, II, 463 (1934).
Fazekas, J. F. and Himwich, H. E. (1936): *Amer. J. Physiol.*, **116**, 46.
Friedemann, T. E., Cotonio, M. and Shaffer, P. A. (1927): *J. Biol. Chem.*, **73**, 335.
Geiger, A. and Magnes, J. (1939): *Biochem. J.*, **33**, 866.
Gemmell, C. L. and Hellerman, L. (1937): *Amer. J. Physiol.*, **220**, 522.
Genevois, L. (1927): *Biochem. Z.*, **191**, 147.
Gill, P. M. and Lehmann, H. (1939): *Biochem. J.*, **33**, 1151.
Good, C. A., Kramer, H. and Somogyi, M. (1933): *J. Biol. Chem.*, **100**, 485.
Hahn, A., Fischbach, E. and Niemer, H. (1930): *Z. Biol.*, **91**, 53.
Hahn, A. and Niemer, H. (1937): *Z. Biol.*, **97**, 195.
Hahn, A. and Niemer, H. (1938): *Z. Biol.*, **98**, 527.
Hahn, A., Niemer, H. and Gosseling, W. (1939): *Z. Biol.*, **99**, 614.
Hahn, A., Niemer, H. and Heiting, H. (1937): *Z. Biol.*, **97**, 578.

- Hanes, C. S. (1929): *Biochem. J.*, **23**, 99.
- Harrison, D. C. (1931 i): *Biochem. J.*, **25**, 1011.
- Harrison, D. C. (1931 ii): *Biochem. J.*, **25**, 1016.
- Harrison, D. C. (1932): *Biochem. J.*, **26**, 1932.
- Harrison, D. C. (1933): *Biochem. J.*, **27**, 382.
- Hoogerheide, J. C. (1935): *Annales fermentat.*, **1**, 385; *Chem. Zbl.*, **II**, 1360 (1936).
- Iri, S. (1938): *J. Biochem.*, **27**, 7.
- Kiessling, W. (1938): *Biochem. Z.*, **298**, 421.
- Kimura, Y. (1940): *Sci. Pap. Inst. physio. a. chem. Res.*, Tokyo, **37**, 488.
- Kimura, Y. (1941): *Sci. Pap. Inst. physio. a. chem. Res.*, Tokyo, **38**, 387.
- Kobayasi, T. (1940): *J. Biochem.*, **32**, 289.
- Kodama, K. (1932): *J. Biochem.*, **15**, 473.
- Krah, E. (1930): *Biochem. Z.*, **219**, 432.
- Krebs, H. A. (1931): *Biochem. Z.*, **234**, 278.
- Krebs, H. A. and Eggleston, L. V. (1940): *Biochem. J.*, **34**, 422.
- Krebs, H. A. and Eggleston, L. V. (1940): *Biochem. J.*, **34**, 442.
- Krebs, H. A. and Johnson, W. A. (1937): *Enzymologia*, **4**, 148.
- Kutscher, W. and Hasenfuss, M. (1940): *Z. physiol. Chem.*, **265**, 181.
- Kutscher, W. and Sarreither, W. (1940): *Z. physiol. Chem.*, **265**, 152.
- Langenbeck, W., Jüttemann, R. Schaefer, O. and Wrede, H. (1933): *Z. physiol. Chem.*, **221**, 1.
- Laser, H. (1935): *Nature*, **136**, 184.
- Laser, H. (1937 i): *Biochem. J.*, **31**, 1671.
- Laser, H. (1937 ii): *Biochem. J.*, **31**, 1677.
- Lennerstrand, Å. (1937): *Naturwiss.*, **25**, 347.
- Lipmann, F. (1933): *Biochem. Z.*, **265**, 113.
- Lipmann, F. (1934 i): *Biochem. Z.*, **268**, 205.
- Lipmann, F. (1934 ii): *Biochem. Z.*, **268**, 314.
- Lohmann, K. (1928): *Biochem. Z.*, **194**, 306.
- Lohmann, K. and Meyerhof, O. (1934): *Biochem. Z.*, **273**, 62.
- Lundsgaard, E. (1930): *Biochem. Z.*, **220**, 8.
- Lynen, F. (1941): *Ann. chem.*, **546**, 120.
- Mendel, B. (1932): cited by Bumm and Appel (1932): *Z. physiol. Chem.*, **210**, 79.
- Mendel, B. (1933): *Z. angew. Chem.*, **46**, 52.
- Meyerhof, O. (1920): *Pflüger's Arch.*, **185**, 11.
- Meyerhof, O. (1927): *Biochem. Z.*, **183**, 176.
- Meyerhof, O. and Boyland, E. (1931): *Biochem. Z.*, **237**, 406.
- Meyerhof, O. and Kiessling, W. (1933): *Biochem. Z.*, **264**, 40.
- Meyerhof, O. and Lohmann, K. (1934): *Biochem. Z.*, **271**, 93.
- Meyerhof, O., Lohmann, K. and Meier, R. (1925): *Biochem. Z.*, **157**, 459.
- Meyerhof, O. and Ohlmeyer, P. (1937): *Biochem. Z.*, **290**, 334.

- Meyerhof, O. and Schulz, W. (1938): *Biochem. Z.*, **297**, 60.
- Michaelis, L. and Smythe, C. V. (1936): *J. Biol. Chem.*, **113**, 717.
- Neuberg, C. (1918): *Biochem. Z.*, **88**, 432.
- Neuberg, C. and Sabetay, S. (1925): *Biochem. Z.*, **161**, 240.
- Oppenheimer, C. (1939): *Die Fermente und ihre Wirkungen*, Supplement II, 1449.
- Ostern, P. (1932): *Biochem. Z.*, **254**, 65.
- Ostern, P. and Holmes, E. (1934): *Nature*, **144**, 34.
- Quastel, J. H. and Wheatley, A. H. M. (1932 i): *Biochem. J.*, **26**, 725.
- Quastel, J. H. and Wheatley, A. H. M. (1932 ii): *Biochem. J.*, **26**, 2167.
- Rapkin, L. (1938): *Biochem. J.*, **32**, 1729.
- Rapoport, S. (1937): *Biochem. Z.*, **291**, 429.
- Runnström, J. (1937): *Naturwiss.*, **25**, 540.
- Runnström, J., Runnström, A. and Sperber, E. (1939): *Naturwiss.*, **25**, 1151.
- Runnström, J. and Sperber, E. (1938): *Nature*, **141**, 689.
- Saslow, G. (1937): *J. cell. comp. Physiol.*, **10**, 385.
- Shorr, E., Barker, S. B. and Malam, M. (1938): *Science*, **87**, 169.
- Smyth, D. H. (1940): *Biochem. J.*, **34**, 1046.
- Stannard, J. N. (1937): *Amer. J. Physiol.*, **119**, 408.
- Szent-Györgyi, A. v. (1937): *Studies on biological oxidation*, p. 41.
- Teorell, T. (1931): *Biochem. Z.*, **230**, 1.
- Tsukano, M. (1932): *J. Biochem.*, **15**, 477; 487.
- Vercellone, A. and Neuberg, C. (1935): *Biochem. Z.*, **280**, 161.
- Wagner-Jauregg, T. and Rzeppa, H. W. (1936): *Z. physiol. Chem.*, **240**, I; **243**, 166.
- Warburg, O. (1926): *Biochem. Z.*, **172**, 432.
- Weil-Malherbe, H. (1938): *Biochem. J.*, **32**, 2257.
- Willstätter, R. and Rohdewald, M. (1940): *Enzymologia*, **8**, 1.

DER ENZYMATISCHE ABBAU DES HISTIDINS.

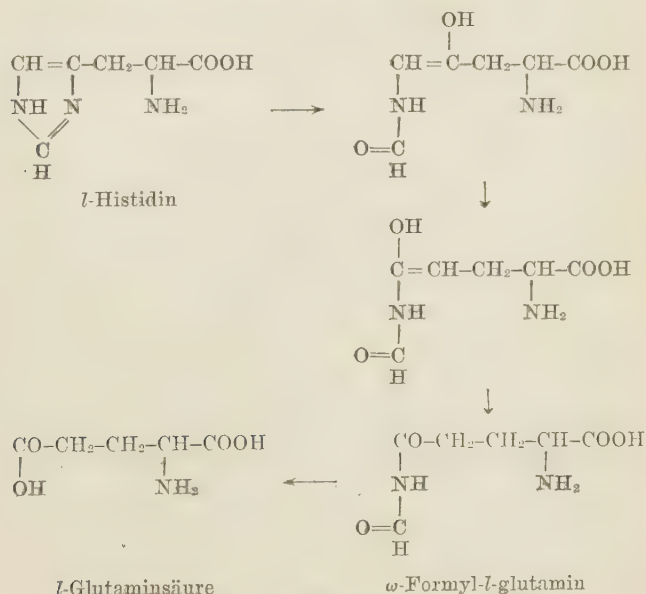
VON

YOSHIO OYAMADA.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 3. September 1942)

Es war die Ansicht von Edlbacher (1926/1930/1931/1934), dass beim Abbau des Histidins durch die Histidase der Imidazol-kern zuerst aufgespalten wird, die α -Amino-Gruppe dagegen nicht desaminiert wird und durchaus intakt bleibt. Er hat wohl als das Spaltprodukt des Histidins die *l*(+)-Glutaminsäure isoliert. Der Verlauf der Abbaureaktion, der nun in den letzten Veröffentlichungen allgemein zitiert ist, sollte folgender sein:



Sera (1939) hat Leberextrakt auf das Histidin einwirken gelassen und aus der Reaktionslösung die Urocaninsäure und das

d,l-Isoglutamin isoliert; er (1940) hat auch beobachtet, dass die Urocaninsäure durch das Leberferment in *d,l*-Isoglutamin überführbar war. Diese Ergebnisse des Histidinabbaues zeigen, dass sich der erste fermentative Angriff zuerst nicht auf den Imidazolring, sondern auf die α -Aminogruppe richtet; sie sprechen gerade gegen die Behauptung von Edlbacher. Takeuchi (1940/1941) hat die Reinigung des Histidinabbauf fermentes ausgeführt und ein Ferment (Histidin-aminase) isoliert, das Histidin mit 100% Ausbeute in die Urocaninsäure überführen kann. Er konnte noch ein anderes Leberferment (Urocanicase) isolieren, durch das die Urocaninsäure vollständig abgebaut wird, während das Histidin dadurch gar keine Spaltung erleidet. Er konnte aus der durch die Urocanicase gespaltenen Urocaninsäurelösung als das Abbauprodukt das *d,l*-Isoglutaminchlorhydrat in reinen Kristallen mit 28% Ausbeute gewinnen. Bei der Sitzung der Fermentforscher am 6. Juni 1942 in Osaka wurde entschieden, dass für jenes Ferment, das das Histidin intramolekular desaminierend zu Urocaninsäure führt, die Benennung Histidase zur Ehre von Edlbacher, der zuerst die fermentative Spaltbarkeit des Histidins gefunden hat, beibehalten wird, während für das andere Ferment, das die Urocaninsäure bis zum Verschwinden der Pauly'schen Diazoreaktion abbaut, die Benennung Urocanicase aufgenommen wird. Wir brauchen daher von jetzt an diese Benennungen.

Vergleicht man nun die chemische Struktur der Urocaninsäure mit der des Isoglutamins, so kann man wohl bemerken, dass der Übergang der Urocaninsäure zu Isoglutamin sicher keine einfache Reaktion ist und dass bei der Urocaninsäurespaltung die komplizierter als das Isoglutamin aufgebauten Substanzen intermediär gebildet werden müssen. Auf dieser Arbeitslinie wurden die Experimente bei uns unter Leitung von Prof. Akamatsu fortgesetzt.

Zuerst wurde bemerkt, dass beim Abbau der Urocaninsäure durch Urocanicase trotz dem endlichen Verschwinden der positiven Diazoreaktion kein Auftreten des nach van Slyke bestimmbaren Stickstoffes gemessen wurde. Dieser Befund zeigt eindeutig, dass das Isoglutamin an und für sich nicht durch die direkte Wirkung der Urocanicase gebildet wird. Diese Verbindung muss also aus

dem noch unbekannten Spaltprodukt der Urocaninsäure während des chemischen Isolierungsverfahren entstanden sein. Das Isolieren dieses intermediären Produkts begegnete anfangs vielen Schwierigkeiten. Takeuchi (1941) hat auch schon verschiedene Verfahren probiert und konnte endlich das *d,l*-Isoglutamin gewinnen.

In Anbetracht, dass jene unbekannte intermediäre Substanz bei ihrem Isolierungsverfahren spontan in Isoglutamin verändert wurde, hat Verfasser gedacht, dass bei der Behandlung der Hydrolysenlösung ein möglichst mildes Verfahren zu verwenden sei. Die endlich ausgewählte Methodik war prinzipiell folgende. Die mit Natronlauge auf Ph 8 neutralisierte Urocaninsäurelösung wurde mit dialysierter Urocanicase gemischt und bei 37° stehen gelassen. Pufferlösung wurde absichtlich nicht zugesetzt, um die Isolierung des Reaktionsprodukts zu erleichtern. Nach dem Verschwinden der Diazoreaktion wurde die Verdauungslösung mit Phosphorsäure auf Ph 5 angesäuert, durch Erwärmen enteiwisst, filtriert, mit aktiver Kohle entfärbt und unter vermindertem Druck bis zu 1/10–1·15 Volumen eingeeengt. Diese konzentrierte Lösung wurde dann wieder mit Phosphorsäure kongorotneutral gemacht und mit Essigäther extrahiert. Der Extrakt wurde unter vermindertem Druck stark eingeeengt und abgekühlt. Es schieden sich farblose nadelförmige Kristalle aus, die im warmen Essigäther gelöst, mit Petroleumäther bis zu beginnender Trübung versetzt und durch Abkühlen wieder als Kristalle ausgeschieden wurden. Diese Substanz zeigte keine Gewichtabnahme beim Trocknen im Vakuum bei 100°. Der Schmelzpunkt war 118° (korr.). Die Ausbeute betrug beim erstmaligen Verfahren 1 g aus 3 g Urocaninsäure mit 2 Molekülen Kristallwasser, beim zweiten Mal 1 g aus 2 g und beim dritten 1,6 g aus 4,8 g. Inzwischen haben Sera und Aihara (1942) auch die Reinigung der Urocanicase ausgeführt und als das Spaltprodukt der Urocaninsäure unter Verwendung dieses Ferments eine Substanz isoliert, die den Schmelzpunkt von 129°–130° und $[\alpha] = -6,08^\circ$ zeigte. Diese linksdrehende Substanz wurde von ihnen Proisoglutamin genannt.

Die von uns isolierten Kristalle waren nach der Elementaranalyse α -Formyl-isoglutamin, und zwar, wie später erwähnt, von

razemischer Form. Kein van Slyke-Stickstoff war nachweisbar. Die Bestimmung der Ameisensäure, die nach der Säurehydrolyse der Kristalle mit Wasserdampf destilliert und demfolgend nach der Sublimat-Reduktionsmethode gravimetrisch gemessen wurde, betrug 90% des theoretischen Werts.

Der Formylrest war mit der α -Aminogruppe des Isoglutamins verbunden vorhanden, weil kein Amino-N nach van Slyke nachweisbar war. Das α -Formyl-*d,l*-isoglutamin sollte sich dann wie eine Monocarbonsäure verhalten. Dies war tatsächlich der Fall. Die wässrige Lösung der Substanz reagierte nämlich ziemlich stark sauer und als ihre gewogene Menge in Lösung gegen Phenolphthalein direkt acidimetrisch titriert wurde, betrug die dabei verbrauchte *N*/10 Natronlauge gerade diejenige Menge, die zur Neutralisation einer Monocarbonsäure erforderlich war. Das Resultat der alkoholischen Titration der Substanz sprach auch für ihre Monocarbonsäure-Natur.

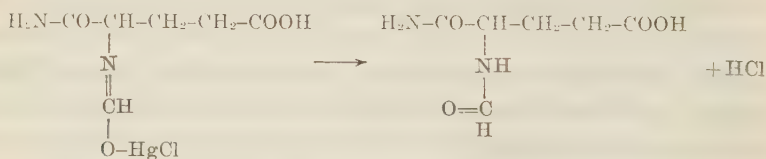
Das von der Urocaninsäure enzymatisch entstandene Formyl-isoglutamin war optisch inaktiv. Es hat die *d,l*-Form. Aber als Bergmann (1936) das Carbobenzoxy-*l*-isoglutamin chemisch von der natürlichen *l*-Glutaminsäure ausgehend synthetisierte, zeigte diese Substanz polarimetrisch keine Drehung, obwohl ihre reduktive Hydrolyse das *l*-Isoglutamin lieferte. Diese Angabe in Betracht ziehend, wurde der obenerwähnte von der Ameisensäure frei gemachte Destillationsrückstand auf die optische Aktivität untersucht. Die Lösung zeigte keine Drehung, obwohl sie 0,9% Glutaminsäure enthalten sollte. Das Formyl-isoglutamin ist von der *d,l*-Form.

Das Formyl-*d,l*-isoglutamin wurde nun als das Spaltprodukt der Urocaninsäure gewonnen. Früher haben Sera (1940) und Takeuchi (1941) aber aus dem Urocaninsäurehydrolysat das *d,l*-Isoglutamin isoliert und zwar in bemerkenswerter Weise hat Takeuchi diese Substanz als ihr Chlorhydrat erhalten, obwohl dabei zu ihrer Isolierung bloss das einfache Quecksilberazetatverfahren statt der diesmaligen Essigäther-Extraktion verwendet wurde. Die chemische Entformylierung des Formyl-*d,l*-isoglutamins ist also sehr leicht möglich. Um diese Frage zu entscheiden,

ist Verf. folgenderweise vorgegangen. Das mit Natronlauge neutralisierte Formyl-*d,l*-isoglutamin wurde nach Kochsalzzusatz mit Salzsäure bis kongorotneutral angesäuert und ihm, wie es Takeuchi früher getan hatte, Quecksilberazetat zugefügt, bis kein weisser Niederschlag mehr entstand, dann die saure Reaktion des Gemisches durch Zusatz von Natronlauge zu Ph 5 abgestumpft. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugieren zweimal mit Wasser gewaschen und seine Aufschwemmung in Wasser durch Schwefelwasserstoff entquecksilbert. Als das klare Filtrat unter verminderstem Druck eingengt und abgekühlt wurde, schieden sich nadelförmige Kristalle aus, die aus einer kleinen Menge 33% Alkohols umkristallisiert und im evakuierten Exsikkator getrocknet wurden. Die Substanz schmolz bei 233° (korr.), zeigte keine Drehung und die Analyse ergab, dass sie das *d,l*-Isoglutaminchlorhydrat war. Die Ausbeute war 44%. Die Gewinnbarkeit des *d,l*-Isoglutamins aus dem Formyl-isoglutamin spricht auch für die razemische Natur des letzteren.

Jetzt war nun nachzuforschen, warum beim Ausführen des Quecksilberverfahrens das *d,l*-Isoglutamin und zwar sein Chlorhydrat aus dem Formyl-*d,l*-isoglutamin gebildet wurde. Als Takeuchi das Spaltprodukt der Urocaninsäure aus der Versuchslösung durch Quecksilberazetat fällte, wurde die Lösung vorher mit Salzsäure versetzt, um die zuerst für die Alkalisierung der Urocaninsäure gebrauchte Natronlauge völlig in Kochsalz überzuführen. Dieser zufälligen Anwesenheit des Kochsalzes entgegen hat der Verfasser diesmal, wie oben erwähnt, der Formyl-*d,l*-isoglutaminlösung schon vor der Quecksilberazetatfällung absichtlich Kochsalz hinzugefügt. Das Formyl-isoglutamin hat nun wegen der Formylgruppe ein reduzierendes Vermögen. Seine Lösung in verdünntem Azetatsgemisch von Ph 5 reduzierte schon bei Zimmertemperatur allmählich das zugesetzte Silbernitrat unter Abscheidung des schwarzen Silbermetalls. Demgemäss war der folgende Gedanke möglich: Das Formyl-isoglutamin reduziert Hg^{++} zu Hg^+ , das sich als Kalomel niederschlägt, während es selbst durch Oxydation der Formylgruppe zu CO_2 in freies *d,l*-Isoglutamin übergeführt wird und dann als Quecksilbersalz ausfällt. Das Gemisch dieses Queck-

silbersalzes und Kalomels liefert also nach Schwefelwasserstoffbehandlung und Konzentrierung schliesslich das *d,l*-Isoglutaminchlorhydrat. Aber die reduzierende Kraft des Formyl-isoglutamins ist nicht beträchtlich stark, und sowohl die durch die Urocanicase gespaltene Urocaninsäurelösung als auch die diesmalige Formyl-isoglutaminlösung wurden nach Quecksilberzusatz bei Ph 5 weder erwärmt noch lange Zeit stehen gelassen; dann muss die oben erwähnte Isoglutaminbildung durch Oxydation des Formyl-isoglutamins, obwohl diese Reaktion sicher stattgefunden hat, doch gering gewesen sein. Daher war es nötig eine andere Möglichkeit zu finden. Wenn das Formyl-*d,l*-isoglutamin bei Anwesenheit des Kochsalzes mit Quecksilberazetat versetzt wird, soll die Formylgruppe des Formyl-isoglutamins mit HgCl_2 in ganz gleicher Weise wie das Formamid mit dem Sublimat verbinden, um ein schwerlösliches salzsaures Mercuri-Salz zu bilden. Wenn diese Quecksilberverbindung durch Schwefelwasserstoff zersetzt wird, soll die Lösung selbstverständlich das Formyl-isoglutamin und Salzsäure in äquimolekularem Verhältnis enthalten und wenn dieses weiter eingeeengt wird, soll die Formylgruppe durch die Salzsäure abgespalten und nach Entweichen der Ameisensäure das Isoglutaminchlorhydrat gebildet werden.



Diese Möglichkeit konnte tatsächlich verwirklicht werden. 5 ccm *M*/10 Formyl-isoglutamin und dasselbe Volumen *N*/10 Salzsäure wurden zusammen bei 37° stehen gelassen, und die Bildung der freien Aminogruppe wurde zeitweise nach van Slyke in 2 ccm des Gemisches bestimmt. 1,52 ccm N_2 war nach 72 Stunden nachweisbar. Die Restprobe wurde weiter bei 40° getrocknet, mit Wasser wieder auf das Volumen vor dem Eindampfen gebracht und auf ihren $\text{NH}_2\text{-N}$ -Gehalt untersucht. Er war 2,19 ccm N_2 -Gas (22°, 765 mm) für 2 ccm der Lösung; 90% ige Entformylierung entstand

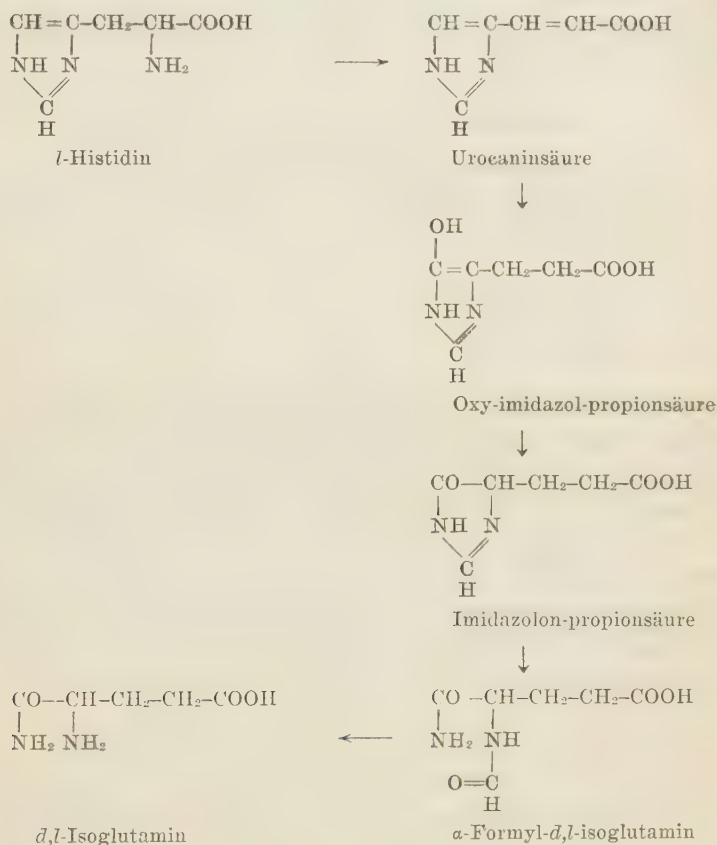
demgemäss durch äquivalente Salzsäure. Durch diese Untersuchungen wurde es nun klar, warum das *d,l*-Isoglutamin als salzsaures Salz aus der durch die Urocanicase gespaltenen Urocaninsäurelösung isoliert wurde.

Das Schicksal des Formyl-*d,l*-isoglutamins in vivo muss dann verfolgt werden. Das Verhalten des Benzoyl-Glycin-Amids, des Benzoyl-isoglutamins und Benzoyl-Arginin-Amids gegen Protease in Betracht ziehend, kann man wohl eine asymmetrische Amidabspaltung des Formyl-*d,l*-isoglutamins erwarten. Dies war aber nicht der Fall. Eine eventuelle Hydrolysierbarkeit der Substanz wurde in verschiedener Weise z. B. durch Papain-CN bei Ph 5, durch Nieren-Glycerinextrakt bei Ph 7 oder durch Leberautolysat bzw. Pankreatin bei Ph 8 untersucht. Es konnte keine Zunahme der alkoholisch titrierbaren Carboxylgruppe festgestellt werden, obwohl zu den Versuchen schliesslich über 2 g Substanz vergeblich verbraucht worden waren. Das Formyl-*d,l*-isoglutamin war also gegen die Proteasen resistent. Man kann jedoch andererseits eine oxydative Abbaubarkeit der Formylgruppe voraussehen, weil das Formyl-*d,l*-isoglutamin wie oben erwähnt eine reduzierende Eigenschaft besitzt. Der folgende Versuch wurde daher angestellt. Zuerst wurde Phosphatextrakt der Meerschweinchenleber mit defibriniertem Blut gemischt und auf das Formyl-*d,l*-isoglutamin bei Ph 7 einwirken gelassen. Die Folge war, dass die Blutfarbe in kurzer Zeit dunkelrot wurde und durch Durchblasen von O₂ wieder zum früheren Hellrot zurückkehrte. Eine probeweise ausgeführte van Slyke-N-Bestimmung ergab im Vergleich mit dem ohne Substratzusatz ausgeführten Kontrollversuch eine deutliche Zunahme der freien Aminogruppe. Dann habe ich beim Ansetzen des nochmaligen gleichen Versuches den Amino-N sofort bestimmt und unter ständiger O₂-Durchleitung bei 37° die Zunahme der freien Aminogruppe zeitweise gemessen. Nach 6–8 Stunden konnte die Hälfte des totalen primärgebundenen Amino-N als freie Aminogruppe nachgewiesen werden. Es war eine 50%ige oxydative Entformylierung des Formyl-*d,l*-isoglutamins. Die Reaktion schritt über diesen Grad nicht fort. Ob dieser Reaktionsstillstand gerade bei 50% Entformylierung eigentlich von der Inaktivierung des Ferments oder

von dem asymmetrisch verlaufenden Abbau verursacht wurde, konnte der Verfasser nicht entscheiden, weil er wegen anderer Umstände die Experimente unterbrechen musste. Es ist aber sicher, dass im Organismus das Formyl-*d,l*-isoglutamin überhaupt nicht in die Formyl-Glutaminsäure und Ammoniak hydrolysiert, sondern oxydativ entformyliert und in das Isoglutamin übergeführt wird. Wenn das *l*-Isoglutamin auf diese Weise gebildet wird, wirkt darauf die nach Sera (1940) hergestellte Isoglutaminase, und die *l*-Glutaminsäure kann nun gebildet werden.

Das Formyl-*d,l*-isoglutamin wurde wie erwähnt, als das fermentative Spaltprodukt der Urocaninsäure isoliert. Wenn man aber nun die chemische Struktur der Urocaninsäure und des Formyl-*d,l*-isoglutamins miteinander vergleicht, merkt man, dass zur Bildung des Formyl-*d,l*-isoglutamins aus der Urocaninsäure die chemische Reaktion noch in zwei Stufen ausgeführt werden soll; sie besteht nämlich erstens im Verschwinden der Doppelbindung und zweitens in der Aufschliessung des heterozyklischen Rings. Wir denken über diesen Chemismus wie folgt. Die Urocanicase ist nicht ein hydrolytisches Ferment, sie übt eine Oxydo-Reduktion der Urocaninsäure aus. Die Urocaninsäure wird dann durch Urocanicase zu der Oxy-imidazol-propionsäure umgewandelt. Diese Verbindung ist eigentlich noch unbekannt. Sie ist das Tautomer der Imidazol-on-propionsäure. Substituiert man aber ihre Imidazol-NH-gruppe mit O, dann bekommt man das Azlacton, das bekanntlich in wässriger Lösung an sich sehr labil ist und spontan zur Acylaminosäure zerfällt. Die analoge Unbeständigkeit der Imidazol-on-propionsäure ist wohl denkbar. Sie wird wohl dann in wässriger Lösung von selbst ohne Einkeilen irgendeiner Fermentwirkung ins Formyl-*d,l*-isoglutamin übergeführt. Wenn dies der Fall wäre, ist die Isolierung der Oxy-imidazol-propionsäure als Spaltprodukt der Urocaninsäure fast aussichtslos. Wir haben tatsächlich aus der durch die Urocanicase abgebauten Urocaninsäurelösung unter Vermeidung aller gewaltsamen Verfahren durch einfache Essigäther-Extraktion das Formyl-*d,l*-isoglutamin isoliert. Die Bildung des Razemkörpers ist durch die spontane Tautomerisation der Oxy-imidazol-propionsäure erklärbar.

Die Reaktionsgleichung des Histidinabbaues wird nach unseren Ergebnissen folgendermassen zusammengefasst ausgedrückt:



EXPERIMENTELLER TEIL.

I. Herstellung der Fermente.

Bei diesen Enzymforschungen werden beide Fermente, Histidase und Urocanicase, nach der Methode von Takeuchi (1941) aus Meerschweinchenleber bereitet. Die Histidase wirkt auf das Histidin bei Ph 9 optimal und die Urocanicase auf die Urocaninsäure bei Ph 8 optimal. Von der nach Kurihara (1939) kolori-

metrisch bemessenen ungespaltenen Histidinmenge wurde der hydrolytische Prozentsatz des Histidins bestimmt. Die Bestimmung der Urocaninsäure hat sich an die Methode von Lang (1933) angelehnt, nach der Takeuchi bei seinen Experimenten über den Histidinabbau verfuhr.

II. Darstellung der Urocaninsäure.

1) Aus 115 g Meerschweinchenleber wurden nach Takeuchi 120 ccm neutralisierte Fermentlösung gewonnen. Ihre Wirksamkeit war folgende:

M/10 Histidin-HCl	2,0 ccm
N/8 NaOH	2,0 "
Fermentlösung	2,0 "
Wasser	2,0 "

Nach 17 Stunden war das Histidin nicht mehr nachweisbar.

2) 7,68 g *l*-Histidinmonochlorhydrat in 400 ccm Wasser wurden daher mit 480 ccm N/10 NaOH + 320 ccm Wasser + 100 ccm der bereiteten Fermentlösung versetzt. Die endliche Konzentration des Histidins betrug M/30. Nach Zusatz von einigen ccm Toluol wurde das Gemisch bei 37° stehen gelassen und nach 4 Tagen wurde es zur Isolierung der Urocaninsäure nach dem Verfahren von Takeuchi behandelt. Die Ausbeute der reinen Urocaninsäure war 5,5 g.

III. Amino-N-Bestimmung bei der Urocaninsäurespaltung durch Urocanicase.

13 g Meerschweinchenleberbrei wurden in 9 fachen Volumen Wasser aufgeschwemmt, durch Zusatz von 3% Ammoniak zu Ph 7 neutralisiert und nach 30 Minuten zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit 5% Essigsäure auf Ph 6 angesäuert und wieder zentrifugiert. 85 ccm einer klaren rötlichen Lösung wurden gewonnen. Sie wurde mit 1/10 Volumen Tonerde C_γ gemischt. Nachdem die Reaktion des Gemisches durch 5% Essigsäure zu Ph 5 korrigiert worden war, wurde das Gemisch 1 Stunde geschüttelt und zentrifugiert. Das Adsorbat wurde dann in 40 ccm Wasser suspendiert, mit Ammoniakzusatz auf Ph 8 alkalisiert und nochmals

1 Stunde lang geschüttelt. 35 ccm zentrifugiertes Eluat brachte man wieder mit 3% Essigsäure auf Ph 6, um noch das ausgefallene Eiweiss zu entfernen und die Lösung weiter mit 3,5 g Kaolin 30 Minuten geschüttelt, von Kaolin abzentrifugiert und gegen Wasser dialysiert. Die Wirksamkeit dieser Fermentlösung vor und nach der Dialyse war folgende:

<i>M</i> /40 neutralis. Urocaninsäure	2,0 ccm
<i>M</i> /10 Phosphatpuffer (Ph 8)	2,0 "
Fermentlösung	2,0 "
Wasser	2,0 "

Spaltung	vor der Dialyse	nach der Dialyse
nach 17 Std.	100%	78%
nach 41 Std.	—	100%

Mit dieser Fermentlösung wurde nochmals die Spaltung der Urocaninsäure, aber von höherer Konzentration als früher, bei Ph 7 ausgeführt und die Zunahme des van Slyke-N wurde gleichzeitig mit 1 ccm Lösung bemessen.

<i>M</i> /10 neutralis. Urocaninsäure	4,0 ccm
<i>M</i> /10 Phosphatpuffer (Ph 7)	4,0 "
Fermentlösung	4,0 "

Ph 7	Urocaninsäure-spaltung	van Slyke-N	
sofort	0	0	24°C; 766 mm
nach 17 Std.	17%	0	24°C; 765 mm
nach 65 Std.	34%	0	26°C; 763 mm

IV. Isolierung des Formyl-*d,l*-isoglutamins.

Die Bereitung der Urocanicase war wie im Experiment III. Aus 120 g Leberbrei von Meerschweinchen wurden 360 ccm dialysierte Fermentlösung gewonnen, deren Wirksamkeit folgende war:

Spaltung	vor der Dialyse	nach der Dialyse
nach 17 Std.	100%	82%
nach 41 Std.	—	100%

3 g Urocaninsäure wurden in 50 ccm Wasser suspendiert und durch Natronlaugezusatz auf Ph 8 neutralisiert, die Lösung mit 345 ccm Fermentlösung und demselben Volumm Wasser gemischt, ihre Reaktion nochmals mit Natronlauge zu Ph 8 korrigiert und das Gemisch unter Zusatz von Toluol bei 37° stehen gelassen. Die endliche Konzentration der Urocaninsäure war $M/80$. Die Diazo-reaktion war nach 5 Tagen negativ. Die Lösung wurde nun mit etwa 4 ccm 8% Phosphorsäure zu Ph 5 angesäuert, im siedenden Wasserbad 10 Minuten erwärmt und filtriert, das Filtrat mit 0,4 g aktiver Kohle entfärbt und unter vermindertem Druck bis etwa 50 ccm eingengt. Zum Konzentrat wurde wieder Phosphorsäure bis kongorotneutral hinzugefügt und dann die Extraktion mit 100 ccm Essigäther ausgeführt. Als der Extrakt unter vermindertem Druck bis zu etwa 3 ccm eingengt und im Eiswasser abgekühlt wurde, schieden sich farblose nadelförmige Kristalle aus, die auf der Nutsche gesammelt und im evakuierten Exsikkator getrocknet wurden. Die Mutterlauge lieferte nach dem Einengen noch eine geringe Meng von Kristallen. Die Kristalle wurden zusammen in warmem Essigäther gelöst, die Lösung mit Petroleumäther bis zur geringen Trübung versetzt und gekühlt. Die gewonnenen Kristalle waren farblose Nadeln und schmolzen ohne Zersetzung bei 118° (korr.). Kein Kristallwasser war vorhanden. Ihre 0,87%ige wässrige Lösung reagierte sauer und war optisch inaktiv. Die Ausbeute war 1,01 g aus 3 g Urocaninsäure $\cdot 2H_2O$. Ich habe diese Darstellung dreimal ausgeführt; beim zweiten Male war die Ausbeute 1 g Kristalle aus 2 g Urocaninsäure, beim dritten Male 1,6 g aus 4,8 g.

Die isolierten Kristalle waren, wie die folgende Analyse ergibt, das Formyl-*d,l*-isoglutamin.

Analyse des Formyl-*d,l*-isoglutamins ($MG=174,1$).

1) Elementaranalyse.

a) C und H Bestimmung.

4,730 mg Substanz gaben 7,160 mg CO_2 und 2,410 mg H_2O .

für $C_6H_{10}O_4N_2$ Ber. 41,35% C, 5,79% H.

Gef. 41,28% C, 5,70% H.

b) N Bestimmung nach Dumas.

2,390 mg Subst. gaben 0,331 ccm N_2 (24° ; 764 mm).für $C_6H_{10}O_4N_2$ Ber. 16,08% N.

Gef. 16,00% N.

2) Bestimmung der N-Verteilung.

43,52 mg Subst. gaben 6,87 mg Kjeldahl-N.

17,41 mg " " 0 mg van Slyke-N.

10,80 mg " " 0,853 mg Amid-N.

für $C_6H_{10}O_4N_2$ Ber. 16,08% Gesamt-N.

Gef. 15,79% "

Ber. 8,04% Amid-N.

Gef. 7,89% "

3) Bestimmung der Ameisensäure.

108,18 mg Subst. sollen geben: Ber. 295,1 mg $HgCl_2$.

Gef. 267,5 mg "

4) Neutralisationsversuche.

A) Alkoholische Titration.

a) 34,82 mg Subst. in 4 ccm Wasser + 36 ccm Alkohol

 $N/5$ KOH-Verbrauch Ber. 1,00 ccm.

Gef. 1,02 ccm.

b) 87,05 mg Subst. in 10 ccm Wasser + 90 ccm Alkohol

 $N/5$ KOH-Verbrauch Ber. 2,50 ccm.

Gef. 2,49 ccm.

B) Einfache Acidimetrie gegen Phenolphthalein.

217,60 mg Subst. in 2 ccm Wasser

 $N/10$ NaOH-Verbrauch Ber. 12,50 ccm.

Gef. 12,48 ccm.

V. *Hydrolytische Entformylierung des Formyl-d,l-isoglutamins.* $M/10$ Formyl-d,l-isoglutamin 5 ccm $M/10$ HCl 5 ccm

Das Gemisch wurde bei 37° stehen gelassen und 2,0 ccm davon jedesmal für die van Slyke-N Bestimmung genommen. Nach 72 Stunden wurden 5 ccm der Lösung bei 40° vollständig getrocknet, wieder in 5 ccm Wasser gelöst und 2,0 ccm davon für Amino-N Bestimmung verwendet.

	N ₂ aus 2,0 cem Lösung	
nach 24 Stdn.	0,54 cem	25°C; 763,5 mm
nach 72 Stdn.	1,52 "	23°C; 763 "
nach Trocknen	2,19 "	22°C; 765 "

VI. Oxydative Spaltung des Formyl-*d,l*-isoglutamins.

11 g Leberbrei (Meerschweinchen) wurden in der 3 fachen Menge *M*/10 Phosphatpuffer (Ph 7,2) 10 Minuten umgerührt und zentrifugiert. Zu 10 cem von diesem Phosphateextrakt wurde dasselbe Volumen defibrinierten Meerschweinchenblutes zugesetzt.

M/10 neutralis. Formyl-*d,l*-isoglutamin 5 cem

Leberextrakt + Blut 5 cem

Kontrolle ohne Substrat, aber statt dessen mit Wasser wurde gleichzeitig angesetzt. Die Ansätze wurden unter Durchblasung von Sauerstoff bei 37° stehen gelassen.

	N ₂ aus 2,0 cem Lösung	
Sofort	0,01 cem	24°C; 763,5 mm
nach 4 Stdn.	1,08 "	26°C; 763,8 "
nach 6 Stdn.	1,15 "	28°C; 763 "
nach 8 Stdn.	1,17 "	26°C; 763 "

VII. Bildung des *d,l*-Isoglutamins aus dem Formyl-*d,l*-isoglutamin.

0,2176 g Formyl-*d,l*-isoglutamin wurde in 1 cem Wasser gelöst, mit 12,48 cem *N*/10 NaOH neutralisiert und dem 0,3 g Natriumchlorid zugesetzt. Das Gemisch wurde mit 10% Salzsäure bis zu kongorotneutral angesäuert, etwa 15 cem 20% Quecksilberazetat zugefügt, bis das Quecksilbersalz vollkommen niederschlug, dann das Gemisch durch 3,5 cem *N*/10 Natronlaugezusatz zu Ph 5 gemacht. Der Niederschlag wurde mit je 30 cem Wasser zweimal durch Zentrifugieren gewaschen, in etwa 150 cem Wasser suspendiert und durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit. Als diese wasserklare Lösung unter vermindertem Druck bis zu 10 cem

eingengt und weiter im evakuierten Exsikkator aufbewahrt wurde, schied sich darin eine kristallinische Masse aus, die von der Mutterlauge befreit und aus 33% Alkohol umkristallisiert wurde. Die Kristalle waren nadelförmig und schmolzen bei 233° (korr.). Ihre wässrige Lösung war optisch inaktiv. Die Ausbeute war 0,1 g aus 0,2176 g Formyl-*d,l*-isoglutamin. Durch die Analyse wurden die Kristalle als identisch mit dem *d,l*-Isoglutaminchlorhydrat erkannt, das früher von Takeuchi aus der fermentativ abgebauten Urocaninsäure direkt mittels Quecksilberverfahrens isoliert worden war.

Analyse des *d,l*-Isoglutaminchlorhydrats (MG=182,6).

45,0 mg Subst. gaben	6,89 mg Kjeldahl-N.
9,0 mg " "	0,678 mg van Slyke-N.
18,0 mg " "	3,43 mg Cl (Volhard).
für $C_5H_{10}O_3N_2 \cdot HCl$	Ber. 15,33% Gesamt-N.
	Gef. 15,31% "
	Ber. 7,67% Amino-N.
	Gef. 7,53% "
	Ber. 19,39% Cl.
	Gef. 19,04% "

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Das l-Histidin wird bei der Einwirkung der Histidase intramolekular zur Urocaninsäure desaminiert.
2. Die Urocaninsäure wird durch Urocanicase oxydo-reduktiv in die Oxy-imidazol-propionsäure übergeführt, die sich zu Imidazolon-propionsäure tautomerisiert.
3. Diese Verbindung wird aber wegen ihrer Labilität ohne eine Ferment-Einwirkung spontan zum α -Formyl-*d,l*-isoglutamin verändert.
4. Das Formyl-*d,l*-isoglutamin kann in Form von reinen Kristallen gewonnen werden.
5. Das Formyl-*d,l*-isoglutamin verliert ihre Formylgruppe leicht durch die Wirkung der Salzsäure. Die frühere Angabe über die Gewinnung des *d,l*-Isoglutaminchlorhydrates kann damit erklärt werden.

6. Das Formyl-*d,l*-isoglutamin ist resistent gegen die Protease, es wird aber durch Leber und Blut oxydativ entformyliert und in das Isoglutamin übergeführt.

Diese Untersuchungen wurden unter Leitung von Prof. Akamatsu mit der finanziellen Unterstützung ausgeführt, die Herrn Professor Akamatsu zur Förderung der wissenschaftlichen Forschungen von dem Unterrichtsministerium zur Verfügung gestellt wurde.

LITERATUR.

- Bergmann, M., Zervas, L. und Fruton, J. S. (1936): J. Biol. Chem., **115**, 539.
Edlbacher, S. (1926): Z. physiol. Chem., **157**, 106.
Edlbacher, S. u. Kraus, J. (1930): Z. physiol. Chem., **191**, 225.
Edlbacher, S. u. Kraus, J. (1931): Z. physiol. Chem., **195**, 267.
Edlbacher, S. u. Neber, M. (1934): Z. physiol. Chem., **224**, 261.
Kurihara, Z. (1939): J. Biochem., **30**, 205.
Lang, K. (1933): Z. physiol. Chem., **222**, 3.
Sera, K. u. Yada, S. (1939): Osaka Igk. Z. (japanisch), **38**, 1107.
Sera, K. u. Yada, S. (1940): Nippon Seikag. Kh. (japanisch), **15**, 3.
Sera, K. u. Aihara, D. (1942): Osaka Igk. Z. (japanisch), **41**, 745.
Takeuchi, M. (1940): Nippon Seikag. Kh. (japanisch), **15**, 135.
Takeuchi, M. (1941): J. Biochem., **34**, 1.

ÜBER DIE SPEZIFITÄT DER ARGINASE.

VON

SHINJI NAKAMURA.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen
Akademie zu China. Direktr: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 3. September 1942)

Sano (1941) hat aus dem Rohrzuckerextrakt der Kaninchendarmschleimhaut mittels des Adsorptionsverfahrens eine Fermentlösung hergestellt, die wohl das nichtnatürliche $d(-)$ -Arginin, aber nicht seine natürliche l -Antipode spalten konnte. Wir haben diesem Ferment die Benennung Heteroarginase gegeben. Diese Fermentlösung war imstande, ausser dem $d(-)$ -Arginin noch l -Argininsäure, α -Acetyl- und Benzoyl- l -Arginin und Carbamino- l - sowie d -arginin aufzuspalten. Das dialysierte Leberautolysat, das bekanntlich eine kräftige Arginase enthielt, bewirkte dagegen keine Hydrolyse des $d(-)$ -Arginins und der obenerwähnten Arginin-Derivate. Die Hydrolysierbarkeit dieser Verbindungen durch Arginase, die bisher von vielen Autoren als bewiesen angegeben wurde, muss darum der Wirkung der in den gebrauchten Arginasepräparaten beigemischten Heteroarginase zugeschrieben werden. Verfasser hat unter Leitung von Prof. Akamatsu die Studien über die Spezifität der Arginase weiter fortgesetzt.

Die Hetero-Arginase kann man auch aus dem Rohrzuckerextrakt der Hühnerniere in gleicher Weise wie aus der Kaninchendarmschleimhaut bereiten. Durch diese Fermentlösung war das $l(+)$ -Arginin nicht, wohl aber seine d -Antipode sowie jene verschiedenen Argininderivate hydrolysierbar. Die Aktivität der Lösung war jedoch geringer als die der Darm-Heteroarginase; diese letztere Fermentlösung wurde daher bei weiterem Versuch gebraucht.

Um den Zusammenhang der Spezifität der Heteroarginase mit der chemischen Konstitution ihrer Substrate auseinander zu setzen, muss man noch das Verhalten der anderen Argininderivate gegen

die Arginase und Heteroarginase untersuchen. Die Experimente ergaben, dass die Guanidinovaleriansäure wohl durch die Heteroarginase gespalten wurde, aber nicht durch die Arginase. Die von Hellermann und Stock (1938) sowie von Richards und Hellermann (1940) angegebene Spaltbarkeit der Guanidinovaleriansäure durch ihr Arginasepräparat soll der in diesem noch beigemischten Heteroarginase zugeschrieben werden. Hinsichtlich der Spaltbarkeit des Agmatins durch die Arginase sind die negativen Angaben von Edlbacher und Bonem (1925), Poller (1937) und Felix und Schneider (1938), dagegen eine positive Angabe von Hellermann und Stock (1940) vorhanden. Das Agmatin war nun nach unseren Untersuchungen weder durch die Heteroarginase noch durch die Arginase spaltbar. Diese Verbindung kann aber, wie noch unten angegeben wird, durch ein ganz anderes Ferment gespalten werden. In Anbetracht dieser sowie der anfangs erwähnten Ergebnisse kann man sagen, dass die Arginin-Derivate, um durch die Heteroarginase angreifbar zu werden, in ihrem Molekülaufbau den folgenden Beschränkungen unterliegen, dass nämlich erstens die Carboxylgruppe in freier Form vorhanden sein muss, zweitens aber keine freie Aminogruppe und zwar von *l*-Konfiguration zugegen sein darf. Diese beiden Bedingungen müssen absolut erfüllt werden. Das *l*(+)-Arginin und das Agmatin sind demgemäss nicht spaltbar. Soweit die Carboxylgruppe vorhanden und unbesetzt ist, kann die α -Aminogruppe sowohl in gebundener, z.B. in der acetylierten, benzoylierten oder carbaminierten Form vorhanden sein, als auch durch die Oxygruppe substituiert werden. Dass die Asymmetrie von dem α -C-Atom des Arginins überhaupt keineswegs mit der Spaltbarkeit durch die Heteroarginase zu tun hat, ist wohl aus dem positiven Beweis der Guanidinovaleriansäure-Spaltung durch dieses Ferment ersichtlich.

Über die physiologische Bedeutung der Heteroarginase kann man folgendes sagen. Die Heteroarginase spaltet eigentlich das freie *l*-Arginin nicht. Wenn aber das Argininmolekül am Ende der Polypeptidkette sitzt, d.h. wenn es mit seiner Aminogruppe an der Peptidbindung teilnimmt und seine Carboxylgruppe in freier

Form beibehält, kann nun die Guanidinogruppe des betreffenden Argininrestes durch die Heteroarginase gespalten werden. Das Arginylarginin war nach Edlbacher (1930) durch das Leberferment unter Harnstoffbildung spaltbar und zwar an der Guanidinogruppe der hinteren Molekülhälfte. Wegen der schwierigen Herstellung dieses Substrats konnten wir den Versuch von Edlbacher nicht nachprüfen. Es ist aber sehr möglich, dass jene Hydrolyse des Arginylarginins wohl durch die damals noch unbekannte Leber-Heteroarginase ausgeübt worden war. Die Heteroarginase ist in der Tat in der Leber vorhanden; die Isolierung dieses Ferments aus der Leber ist jedoch wegen ihres reichlichen Arginasegehaltes schwer durchführbar.

Die nächste Aufgabe ist die fermentative Spaltung des Agmatins. Diese Verbindung, das decarboxylierte Arginin, konnte wie oben erwähnt weder durch die Arginase noch durch die Heteroarginase gespalten werden. Sie war aber durch den *Bacillus coli communis* spaltbar. Diese Bakterien waren betreffs des Abbaues der Guanidinogruppe nach unseren Untersuchungen ganz unwirksam auf *l*(+)-Arginin und auch auf *d*(-)-Arginin, *l*-Argininsäure, acyliertes Arginin und Carbamino-*l*-arginin, nämlich die Substrate der Heteroarginase. Über die Arginasefreiheit dieser Bazillen sind schon die Angaben von Hino (1924) und Sendyu (1925) vorhanden. Die Hydrolyse des Agmatins wird also durch ein spezifisches Ferment bewirkt. Wir haben dieses Ferment vorläufig Agmatinase genannt. Die von Richards und Hellermann (1940) angegebene Spaltbarkeit des Agmatins durch die Leberarginase kann vielleicht der in dem Fermentpräparat beigemischten Agmatinase zugeschrieben werden. Zum positiven Beweis der Agmatinspaltung wurde nach der Angabe der amerikanischen Autoren allerdings eine 170 Mal so grosse Fermentmenge wie bei der Argininspaltung gebraucht. Wir konnten tatsächlich die Anwesenheit der Agmatinase und auch der Heteroarginase in der Kaninchenleber nachweisen. Die Trennung dieser Fermente voneinander sowie von der Arginase war aber schwer ausführbar. Wir haben daher darauf verzichtet und zu den weiteren Versuchen ausschliesslich *Coli*-Bazillen als Agmatinase verwendet. Wir

konnten andererseits beweisen, dass das Agmatin durch die Agmatinase unter 100% Harnstoffbildung gespalten wurde und wir haben aus dem Hydrolysat das Putreszin in 80% Ausbeute als Pikrat rein gewonnen. Das zu dem vorliegenden Experiment gebrauchte Agmatinsulfat wurde nach Gale (1941) in 80% Ausbeute durch fermentative Decarboxylierung des Arginins bei $\text{pH } 4$ unter Verwendung von Coli-Bazillen hergestellt.

Wenn man überlegt, dass diese Bazillen arginasefrei sind und dass sie das Arginin in das Agmatin überführen und das letztere weiter zu Putreszin und Harnstoff aufspalten können, so muss die in der Literatur zitierte Putreszinbildung durch Coli-Bazillen ausschliesslich oder wenigstens hauptsächlich über den Zwischenweg der Agmatinbildung verlaufen. Diese Agmatinbildung findet bei saurer Reaktion statt. Diese Bedingung kann durch den bakteriellen Abbau der beigemischten Glukose verwirklicht werden. Die zweite Reaktion, die Putreszinbildung, wird bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion bewirkt. Durch Decarboxylierung des Arginins oder durch andere Ursachen, z.B. durch weiteren Abbau der sauren Zuckerspaltprodukte, wird die saure Reaktion des Mediums abgestumpft, um so die notwendigen Bedingungen zur Agmatinasewirkung zu bereiten. Ein Beweis der Harnstoffbildung aus Arginin zeigt also nicht unbedingt die Anwesenheit der Arginase in den Coli-Bazillen. Der Harnstoff könnte dann nicht direkt aus Arginin, sondern sekundär aus Agmatin geliefert werden.

Die Spezifität der Agmatinase muss durch Experimente mit anderen Verbindungen festgestellt werden. Das von dem Verfasser neu hergestellte Oxybutyl-Guanidin wird durch die Agmatinase gut gespalten. Es ist aber wie das Agmatin weder durch die Arginase noch durch die Heteroarginase spaltbar. Arcain, das Butylen-*di*-guanidin, verhält sich in gleicher Weise wie das Oxybutyl-guanidin. Die Unspaltbarkeit des Arcains durch die Arginase hat schon Baldwin (1934) angegeben. Nach Kiesel (1922) konnte andererseits *Aspergillus niger* bei langer Einwirkung das Arcain aufspalten, aber das Agmatin nicht. Der Versuch des Verfassers ergab, dass dieser Pilz weder auf das Arcain noch auf

das Agmatin wirksam war. Soweit die Angabe von Kiesel nicht bewiesen ist, möchten wir die von uns beobachtete Spaltung des Arcains der Agmatinasewirkung zuschreiben.

Das Agmatin ist das decarboxylierte Arginin. Für die Hydrolysierbarkeit durch die Agmatinase kann die Aminogruppe durch die Oxygruppe oder durch Guanidinogruppe wie bei dem Oxybutylguanidin bzw. Arcain substituiert werden. Die Bedingung der Spaltbarkeit ist aber das Fehlen der Carboxylgruppe. Das einfache Decken der Carboxylgruppe des Arginins ist nicht hinreichend, um diese Aminosäurederivate zum Substrat der Agmatinase zu machen. Das Argininhydantoin konnte nämlich durch die Agmatinase nicht gespalten werden. Dieses Substrat ist nicht durch die Arginase, wie von Hunter (1938) zuerst mitgeteilt, und auch nicht durch die Heteroarginase spaltbar.

Bei dem Argininhydrantoin nehmen sowohl die Carboxylgruppe als auch die Aminogruppe an der Bildung des heterozyklischen Ringes teil. Man kann vermuten, dass jene Unzugänglichkeit der Agmatinase irgendwie mit dem heterozyklischen Kern zusammenhängt. Um diese Möglichkeit auszuschliessen, wurde die fermentative Harnstoffbildung aus dem Methyl- sowie Äthylester des Arginins untersucht. Da die beiden Ester bei $\text{pH } 9$ spontan verseifbar sind, wurde der Versuch bei $\text{pH } 7$ ausgeführt. Durch die Agmatinase konnte kein Harnstoff aus jenen Estern gebildet werden. Arginase bewirkte wohl eine Harnstoffabspaltung und zwar schneller aus dem Methylester als aus dem Äthylester. Wenn man aber in Betracht zieht, dass der Argininester auch bei $\text{pH } 7$ überhaupt und dabei der Methylester schneller als der Äthylester von selbst verseift wird, muss jener bewiesene Harnstoff wohl aus dem spontan frei gemachten Arginin sekundär durch die demfolgende Arginase-Einwirkung gebildet worden sein. Die Nichtspaltbarkeit des Argininesters durch Arginase wurde in analoger Weise früher von Edlbacher und Bonem (1925), Felix, Müller und Dirr (1928) sowie von Calvery (1934) angegeben. Nach der gebildeten Harnstoffmenge geschätzt, sollte bei uns selbst nach einer Stunde über die Hälfte der Ester noch unverseift zurückbleiben. Auf diesen noch nicht verseiften Esteranteil konnte

die Agmatinase nicht einwirken, was dafür spricht, dass der Argininester nicht ein spaltbares Substrat der Agmatinase ist.

Benzoyl-*l*-arginin-amid wurde dann untersucht, bei dem die Carboxylgruppe amidiert vorhanden ist. Diese Bindung ist ziemlich resistent gegen die alkalische Reaktion, aber nach Bergmann (1939) durch Protease hydrolysierbar. Der Versuch ergab, dass das Benzoyl-arginin-amid bei Einwirkung der Coli-Bazillen bei PH 9 mit einer äusserst geringen Ammoniakabspaltung reagierte, aber dass es dabei keinen nach der Ureasmethode nachweisbaren Harnstoff lieferte. Es ist hinzufügen, dass diese Bazillen nicht imstande waren, Harnstoff abzubauen. Das Benzoyl-arginin-amid ist darum durch die Agmatinase nicht spaltbar. Ob solche der Agmatinase widerstehenden Verbindungen, wie das Argininhydantoin, die Argininester oder das Benzoyl-arginin-amid überhaupt an ihrer Guanidinogruppe abgebaut werden kann und ob irgendein dazu fähiges Ferment, das aber nicht die schon bekannte Arginase, Heteroarginase oder Agmatinase sein darf, in der Natur wirklich vorkommt, bleibt dahingestellt.

Bei der Auseinandersetzung der physiologischen Bedeutung der Heteroarginase haben wir eine Hypothese aufgestellt, dass dieses Ferment direkt auf den aminogebundenen Argininrest z.B. auf denjenigen des Leucyl-glycyl-arginins einwirken und die Guanidinogruppe abbauen soll. Bei der Agmatinase darf die Carboxylgruppe des Arginins weder in freiem noch gebundenem Zustand bestehen bleiben. Man kann daher schliessen, dass, wenn der Argininrest mit seiner Carboxylgruppe an der Spitze der Polypeptidkette peptidisch gebunden oder mit seiner Carboxylgruppe und zugleich auch mit seiner Aminogruppe innerhalb der Peptidkette beiderseitig gebunden vorhanden ist, dann seine Guanidinogruppe nicht mehr durch die Agmatinase, selbstverständlich auch nicht durch die Arginase oder Heteroarginase abgebaut werden kann. Die Agmatinase hat daher mit dem Arginin gar nichts zu tun. Deshalb wurde die Benennung Agmatinase für dieses Ferment gewählt.

Der Wirkungsbereich der Arginase ist nun klar geworden. Sie spaltet das *l*(+)-Arginin. Sowohl die Carboxyl- als auch die

Aminogruppe müssen intakt und unbesetzt bleiben und die natürliche *l*-Konfiguration der freien Aminogruppe ist eine absolute Bedingung. Sano (1941) hat mit Kitagawa (1938) übereinstimmend angegeben, dass das natürliche *l*-Canavanin durch die Arginase spaltbar ist. Die Substitution einer Methylengruppe des Arginins, die seiner Guanidinogruppe benachbart ist, durch ein Sauerstoffatom übt also keinen Einfluss auf sein spezifisches Verhalten gegen die Arginase aus, weil bei dem Canavanin die Carboxylgruppe frei bestehen bleibt und die freie Aminogruppe in *l*-Konfiguration vorhanden ist.

Unsere bisherigen Versuche beziehen sich ausschliesslich auf die Argininderivate oder ihre decarboxylierten Verbindungen. Das fermentative Verhalten der C-reicheren oder ärmeren Verbindungen soll fortgesetzt untersucht werden. Unsere experimentell ausgeführte Klassifikation der die Guanidinogruppe abbauenden Fermente wird tabellarisch wie folgt zusammengestellt.

Arginase	Hetero-arginase	Agmatinase	(-)
<i>l</i> (+)-Arginin	<i>d</i> (-)-Arginin	Agmatin	<i>l</i> -Arginin-hydantoin
<i>l</i> (+)-Canavanin	<i>l</i> -Argininsäure	Oxybutyl-guanidin	<i>l</i> -Arginin-methylester
	Acetyl- <i>l</i> -arginin	Arcaïn	<i>l</i> -Arginin-äthylester
	Benzoyl- <i>l</i> -arginin		Benzoyl- <i>l</i> -argininamid
	Carbamino- <i>l</i> -arginin		
	Carbamino- <i>d</i> -arginin		

EXPERIMENTELLER TEIL.

l(+)-Argininmonohydrochlorid wurde aus Gelatine (Fuji) nach Bergmann und Zervas (1927) hergestellt und daraus *dl*-Arginin nach Felix und Dirr (1928) bereitet. *l*-Arginin-methylester-chlorhydrat wurde nach Fischer und Suzuki (1905) hergestellt. $F = 193$ (korr.) Das Äthylester-chlorhydrat nach Calvery und Block (1934); $F = 114$ (unkorr.). Zur Herstellung des *d*(-)-Arginins bediente man sich der asymmetrischen Spaltung

des razemischen Arginins nach Sano (1941); Ausbeute 0,96 g aus 8 g *l*(+)-Arginin-monohydrochlorid. α -Monoacetyl-*l*-arginin, α -Monobenzoyl-*l*-arginin und Carbamino-*l*-arginin waren die von Sano (1941) hergestellten Präparate. *l*-Arginin-hydantoin wurde nach Boon und Robson (1935) hergestellt. $F=90^\circ$ (unkorr.). Benzoyl-*l*-arginin-amid Hydrochlorid wurde nach Bergmann und Zervas (1939) aus Benzoyl-*l*-arginin hergestellt. Die Ausbeute war 0,8 g aus 1,3 g Benzoyl-*l*-arginin.

Agmatinsulfat ($C_5H_{14}N_4 \cdot H_2SO_4$). Das Verfahren von Gale (1940) wurde etwas modifiziert und vereinfacht. Ein *Coli communis*-Stamm von dem hygienischen Institut der hiesigen Akademie wurde in 20 ccm 2% Glukose-Bouillon 20 Stunden lang gezüchtet. Die Kultur wurde dann in 2000 ccm 2% Glukose-Bouillon eingegossen und bei 27° 18 Stunden stehen gelassen. Die Azidität der Kulturflüssigkeit wurde sauer, das P_H war 5,2. Die Bazillen wurden dann durch Zentrifugieren gesammelt, 3 Mal gewaschen und in 40 ccm Wasser aufgeschwemmt. 4,2 g Arginin-monohydrochlorid in 200 ccm Wasser + 45 ccm *M*/10 Acetatpuffer (P_H 4,0) wurden mit jenen 40 ccm Bazillensuspension gemischt und in Brutschrank bei 37° stehen gelassen. Nach 2 Tagen wurde das noch nicht decarboxylierte Arginin durch die Arginase-Urease Methode gemessen. Es blieben nur 10% des zugesetzten gesamten Arginins ungespalten. Am nächsten Tage wurde die Lösung zentrifugiert, bei P_H 5 30 Minuten lang auf 100° erhitzt, filtriert, zu 150 ccm eingengt, mit 9,2 g Pikrinsäure in 100 ccm Alkohol versetzt, kurz erhitzt und dann abgekühlt. Die ausgeschiedenen Kristalle von Agmatinpikrat wurden aus 50 ccm heissem Wasser umkristalliert. Der Schmelzpunkt war 236 (korr.). Die Ausbeute betrug 10 g, was 85% des verwendeten Arginins gleichkommt. Dieses Pikrat wurde in überschüssiger Schwefelsäure suspendiert und im Soxhletischen Apparat mit Äther extrahiert, bis die wässrige Schicht vollständig entfärbt war. Diese Lösung wurde dann mit Baryt gegen Kongo neutralisiert, filtriert, das Bariumsulfat mit Wasser ausgewaschen, das Filtrat und die Waschflüssigkeit zusammen unter vermindertem Druck bei 60° eingengt, mit Methanol versetzt und einen Tag in den Eisschrank gestellt. Die kristalli-

sierte Masse war schon reines Agmatinsulfat. $F=232$ (korr.). Die Ausbeute war genügend; 3,8 g aus 10 g Agmatinpicrat. Der Verfasser konnte also aus Arginin in einfacher Weise das Agmatin als Sulfat in 83% Ausbeute herstellen.

Oxybutyl-guanidin sulfat ($C_5H_{13}O_1N_3 \cdot \frac{1}{2}H_2SO_4$): 1 g Agmatin sulfat (1 Mol) in 65 ccm $N/10$ HCl (1,5 Mol) wurde portionsweise mit 1,012 g Silbernitrit (1,5 Mol) versetzt. Nach anderthalb Stunden, währendessen die Stickstoffgas-Entwicklung schon aufgehört hatte; wurde das Gemisch mit Baryt gegen Kongo neutralisiert, unter vermindertem Druck ein wenig eingengt, von geringem Silber durch Schwefelwasserstoff befreit, mit aktiver Kohle entfärbt, wieder unter vermindertem Druck eingengt und mit Alkohol versetzt. Am nächsten Tage wurde die auskristallisierte Masse in wenig Wasser gelöst und wieder mit Alkohol bis zur schwachen Trübung versetzt. Beim Reiben der Glaswand schied sich das Oxybutyl-guanidin-sulfat in Form von prismatischen Kristallen aus. $F=228^\circ$ (unkorr.). Der Kjeldahl-N-Gehalt stimmte mit dem theoretischen Wert überein.

Arcainsulfat ($C_6H_{16}N_6 \cdot H_2SO_4$): Agmatinsulfat (1 Mol) wurde in Wasser gelöst und von der Schwefelsäure mittels Barytlösung quantitativ befreit. Die Lösung wurde dann unter vermindertem Druck und unter Ausschluss von Kohlensäure stark eingengt, mit methanolischer Lösung des freien 0-Methylisoharnstoffes (3 Mol) versetzt und vier Tage in den Eisschrank gestellt. Dieses Guanidinierungsverfahren lehnte sich an die Methode von Kapfhammer und Müller (1934) eng an. Zyanamid wurde nach dem schönen Verfahren von Sugino und Kanayama (1940) bereitet. Herr Prof Sugino hat uns freundlich eine genügende Menge Zyanamid überlassen, wofür wir ihm bei dieser Gelegenheit herzlichen Dank sagen. 0-Methylisoharnstoff-chlorhydrat wurde aus Zyanamid nach Stieglitz und McKee (1900) hergestellt und nach Kapfhammer und Müller (1934) mittels Natriummethylat in die freie Base übergeführt. Das oben erwähnte Guanidinierungsgemisch wurde unter vermindertem Druck getrocknet, in wenig Wasser gelöst und mit Schwefelsäure gegen Kongo neutralisiert. Arcainsulfat kristallisierte in Nadeln und es wurde aus Wasser umkristalli-

siert. F war 295° (unkorr.) und etwas höher als die Angabe (291°) von Kiesel (1922).

δ -Guanidino-valeriansäure: Zuerst wurde Cyclopentanon aus Adipinsäure nach der Vorschrift in Organic Synthesis, V., dargestellt und dann nach Hentzschel und Wislicenus (1893) in Pentanonoxim übergeführt. Das aus Petroleumäther umkristallisierte Oxim wurde nach Wallach (1900) zu Isoxim umgewandelt und durch Einleiten des Salzsäuregases in seine ätherische Lösung wurde das Chlorhydrat in Form von Kristallen gewonnen. Dieses wurde dann mit 20% Salzsäure 15 Stunden gekocht, die Lösung durch aktive Kohle entfärbt und auf dem Wasserbad eingedampft. Farblose Kristalle von der salzsauren δ -Aminovaleriansäure blieben zurück, die von der Mutterlauge abgesaugt und im Exsikkator getrocknet wurden. Dieses Chlorhydrat wurde dann in Wasser gelöst, mittels einer berechneten Menge Silberoxyd zur freien Aminosäure übergeführt und unter vermindertem Druck eingengt. Die nächste Guanidinierung mit alkoholischer Lösung des freien O-Methyl-isoharnstoffes wurde prinzipiell nach Kapfhammer und Müller (1934) ausgeführt. Ausgeschiedene nadelförmige Kristalle von δ -Guanidinovaleriansäure wurden abgesaugt und aus Wasser umkristallisiert. F= 275° (unkorr.).

VERSUCHSANORDNUNG.

Die Fermentversuche wurden durchweg bei 37° ausgeführt. Die Zusammensetzung der Versuchslösungen war, wo nicht besonders angegeben, folgende:

M/10 Substrat	4,0 ccm
N/10 NaOH	2,0 ccm
Wasser	4,0 ccm
M/100 MnSO_4	2,0 ccm
M/10 Glykokoll-NaOH	4,0 ccm
Fermentlösung	4,0 ccm

Bei diesem allgemeinen Versuchsansatz wurden 2 ccm NaOH verwendet, wenn das Substrat Chlorhydrat war. War das Substrat ein Sulfat, so wurde es in der Lösung durch Umsetzen mit einer berechneten Menge Bariumchlorid in Chlorhydrat übergeführt.

Sonst siehe die Mitteilung von Sano (1941). Bei jedem Versuch wurde eine Kontrolle ohne Substratzusatz angestellt. Die hydrolytische Harnstoffabspaltung wurde mittels der Ureasemethode gemessen. 5 ccm Versuchslösung wurde nämlich nach einer bestimmten Zeit auspipettiert, im siedenden Wasserbad 15 Minuten erhitzt, nach Abkühlen mit 4 ccm *M*/10 Phosphatpuffer von pH 7 und 4 ccm 2% Urease versetzt und das gebildete Ammoniak wie üblich nach Soda-Folin bei 50° destilliert. Titration mit *N*/50 NaOH. Urease war das nach van Slyke und Cullen (1914) aus Sojabohnen dargestellte, trockene Pulver und frei von Arginase. Der hydrolytische Prozentsatz wurde nach Abzug des Kontrollwertes ausgerechnet.

ERGEBNISSE.

1. *Heteroarginase der Hühnerniere.*

Das zermahlene Organ wurde mit 5 fachem Volumen einer 10% wässrigen Rohrzucker-Lösung versetzt, 18 Stunden in den Eisschrank gestellt und zentrifugiert. Dieser Extrakt enthält nun die Arginase, aber auch die Heteroarginase.

TABELLE I.

pH 9,2 mit Mn	Spaltung nach		
	1 Stde	2 Std	24 Std
<i>l</i> (+)-Arginin	23%	54%	/
<i>d</i> (-)-Arginin	9,2%	15,5%	34,4%
<i>l</i> -Argininsäure	5,6%	10,3%	34,8%
Carbamino- <i>l</i> -arginin	4,8%	5,8%	18,8%
Benzoyl- <i>l</i> -arginin	5,4%	7,4%	19,2%
Acetyl- <i>l</i> -arginin	4,4%	7,0%	28,4%

Aus diesem Extrakt wurde die Heteroarginase nach der Adsorptionsmethode von Sano (1941) hergestellt. Die Hydrolyse des *d*(-)-Arginins durch diese Fermentlösung fand bei pH 9 optimal statt und die Reaktion war durch Mn aktivierbar.

TABELLE II.

	ohne Mn		mit Mn	
	nach 1 Stde	nach 2 Stdn	nach 1 Stde	nach 2 Stdn
PH 7	0%	2%	4%	6%
PH 8	4%	8%	8%	12%
PH 9	6%	9%	9%	17%
PH 10	4%	8%	8%	11%

Die Wirkung dieser gereinigten Heteroarginaselösung auf verschiedene Argininderivate wurde daher unter Mn-Zusatz untersucht.

TABELLE III.

PH 9, mit Mn	nach 1 Stde	nach 2 Stdn	nach 24 Stdn
l(+)-Arginin	0%	0%	2%
d(-)-Arginin	9%	14%	29%
Argininsäure	5%	7%	21%
Carbamino-arginin	5%	6%	12%
Benzoyl-arginin	5%	7%	14%
Acetyl-arginin	5%	7%	19%

2. Heteroarginase der Kaninchendarmschleimhaut.

Diese Fermentlösung wurde nach Sano (1941) aus dem Rohrzuckerextrakt nach dem Adsorptionsverfahren dargestellt. Ihre Wirkung auf verschiedene Guanadin-Verbindungen war folgende:

TABELLE IV.

PH 9, mit Mn	nach 2 Stdn	nach 24 Stdn
l(+)-Arginin	0%	3%
d(-)-Arginin	13%	48%
Guanidino-valeriansäure	9%	34%
Agmatin	0%	0%
Oxybutyl-guanidin	0%	1%
Kreatin	0%	0%
Glykozyamin	0%	1%

3. *Arginase (dialysiertes Autolysat der Schweineniere).*

Über die Herstellung dieser Fermentlösung siehe die Mitteilung von Sano (1941).

TABELLE V.

PH 9, mit Mn	nach 2 Stdn	nach 24 Stdn
l(+)-Arginin	100%	100%
Guanidino-valeriansäure	0%	0%
Agmatin	0%	0%
Oxybutylguanidin	0%	0%
Kreatin	0%	0%
Glykozyamin	0%	0%

4. *Agmatinase in Kaninchenorganen.*

Zermahlene Organe wurden 18 Stunden im Eisschrank mit 5 fachen Volumen einer 10% wässrigen Rohrzuckerlösung extrahiert. Das Ferment der Agmatinspaltung kam nur in der Leber vor.

TABELLE VI.

PH 9, mit Mn	nach 1 Stde	nach 18 Stdn
Leber	4%	18%
Darmschleimhaut	0%	0%
Hoden	0%	0%
Niere	0%	0%

Die Wirkung der Leberagmatinase war durch Mn aktivierbar.

TABELLE VII.

PH 9	nach 2 Stdn	nach 24 Stdn
mit Mn	5%	29%
ohne Mn	3%	20%

PH-Optimum der Leberagmatinase (mit Mn-Zusatz) war PH 10.

TABELLE VIII.

PH	6,0	7,0	8,0	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0
nach 24 Std'n	2%	7%	15%	18%	30%	32%	31%	5%

Der Rohrzuckerextrakt wurde in gleicher Weise wie bei der Heteroarginaseherstellung mit Tonerde behandelt. Die eluierte Fermentlösung war wirksam auf *l*-Arginin, *d*-Arginin und Agmatin.

TABELLE IX.

PH 9, mit Mn	<i>l</i> (+)-Arginin	<i>d</i> (-)-Arginin	Agmatin
nach 24 Std'n	76%	37%	8%

Sowohl die Heteroarginase als auch die Agmatinase der Leber voneinander sowie von der Arginase getrennt herzustellen, war schwer ausführbar. Die Leber-Arginaselösung, die weder Heteroarginase noch Agmatinase enthielt, konnte dagegen wie oben erwähnt in einfacher Weise durch eine einfache Autolyse des Organs bereitet werden.

5. Agmatinase in den Coli-Bazillen.

Bazillen wurden auf den Schräg-Agar-Nährboden in Folin Reagenzröhren gezüchtet. Nach 24 Stunden wurden die Bazillen zusammengescharrt, einmal mit Wasser durch Zentrifugieren gewaschen und in 10 ccm Wasser aufgeschwemmt. Wie bei anderen Versuchen wurden 2 ccm davon als Fermentlösung gebraucht.

TABELLE X.

PH 9, mit Mn	Agmatin	<i>l</i> (+)-Arginin	<i>d</i> (-)-Arginin
nach 24 Std'n	87%	1%	1%

Die Bazillensuspension wurde bei -20° gefroren und dann bei 37° aufgetaut; dieses Verfahren wurde 10 Mal wiederholt. Nach Zentrifugieren wurde bewiesen, dass die Suspension des Bodensatzes eine 70%ige Agmatinspaltung, die überstehende Lösung

dagegen nur eine 5%ige Hydrolyse bewirkte. Die unter Toluolzusatz 24 Stunden bei 37° aufgestellte Bazillensuspension behielt das Ferment noch in den Bazillenleibern (50%ige Agmatinspaltung) und die zentrifugierte klare Lösung war auf das Agmatin vollkommen unwirksam.

Die Hydrolyse der verschiedenen Guanidin-Verbindungen durch Coli-Suspension war folgende:

TABELLE XI.

PH 9, mit Mn	nach 2 Std'n	nach 24 Std'n
Agmatin	12%	66%
Oxybutylguanidin	15%	75%
Argininsäure	0%	1%
Carbamino-l-arginin	0%	1%
Acetyl-arginin	0%	0%
Benzoyl-arginin	0%	0%
Guanidino-valeriansäure	0%	0%
Kreatin	0%	1%
Glykozyamin	0%	0%

6. Putreszinbildung aus dem Agmatin durch Agmatinase.

Coli-Bazillen wurden 18 Stunden in 5 Reagenzröhrchen auf Schrägagar-Nährboden gezüchtet, einmal mit Wasser gewaschen und in 50 cem Wasser suspendiert. 1,14 g Agmatinsulfat wurde andererseits in Wasser gelöst und mit 1,04 g Bariumchloridlösung versetzt, das Bariumsulfat wurde abfiltriert und zweimal mit Wasser gewaschen. Das Filtrat und die Waschflüssigkeit wurden vereinigt, mit Wasser auf 100 cem aufgefüllt, dann mit 25 cem $N/10$ NaOH + 50 cem Glykokoll-Natron (PH 9) + 25 cem $M/100$ $MnSO_4$ + 50 cem jener Coli-Suspension versetzt und in Brutschrank von 37° gestellt. Nach 2 Tagen wurde nach der Ureasemethode 55% und nach 5 Tagen 94% Harnstoffabspaltung nachgewiesen. Am 7. Tage wurde der Hydrolysenlösung, die unangenehm stank, 0,061 g Bariumchlorid hinzugefügt und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Die noch schwach getrübe Lösung wurde mit

Essigsäure zu PH 5 angesäuert, auf 100° erhitzt und zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde dann mit 2,8 g Pikrinsäure versetzt, erhitzt und abgekühlt. Putreszinpikrat schied sich in gelben Nadeln aus. Es wurde aus Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute war 2,2 g, d.s. 80% der Theorie. F=250 (korr.).

7. *Hydrolyse des Arcains.*

A. Durch Agmatinase (Coli-Bazillen).

TABELLE XII.

PH 9, mit Mn	Arginase		Heteroarginase		Coli-Agmatinase	
	n. 2 Stdn	n. 24 Stdn	n. 2 Stdn	n. 24 Stdn	n. 2 Stdn	n. 24 Stdn
l(+)-Arginin	94%	100%				
d(-)-Arginin			17%	43%		
Agmatin					14%	83%
Arcain	1%	2%	1%	2%	8%	24%

B. Wirkung von *Aspergillus niger*. Ein Stamm dieses Pilzes wurde uns von dem Agrikulturchemischen Institut, Tokyo Kaiserliche Universität überlassen, wofür der Verfasser herzlichen Dank ausspricht. Der 2 Tage auf Schräg-Agar-Nährboden gezüchtete Pilz wurde im Mörser unter Toluolzusatz umgerührt und in Wasser gleichmässig aufgeschwemmt. Durch diese Pilzsuspension wurde aber keine deutliche Spaltung der folgenden Guanidino-Verbindungen beweisbar.

TABELLE XIII.

PH 9, mit Mn	nach 2 Stdn	nach 24 Stdn
l(+)-Arginin	1%	5%
d(-)-Arginin	0%	0%
Agmatin	0%	1%
Arcain	1%	1%

8. *Hydrolyse des l-Arginin-hydantoins.*

TABELLE XIV.

PH 9, mit Mn	Bac. coli		Bac. pyocyaneus	
	nach 2 Stdn	nach 24 Stdn	nach 2 Stdn	nach 24 Stdn
Arginin-hydantoin	0%	0%	0%	0%
Agmatin	12%	66%	0%	2%
Oxybutylguanidin	15%	75%	0%	2%
Arcain	6%	33%	0%	0%

9. Arginin-ester.

M/10 Argininester · 2HCl	4 ccm
M/10 Na ₂ CO ₃	4 ccm
Wasser	2 ccm
M/100 MnSO ₄	2 ccm
M/10 Phosphat (PH 7)	4 ccm
Ferment	4 ccm

TABELLE XV.

PH 7, mit Mn	Bac. coli		Arginase	
	nach 1 Stde	nach 2 Stdn	nach 1 Stde	nach 2 Stdn
l(+) - Arginin			94%	100%
Agmatin	7%	12%		
Arginin-methylester	0%	0%	31%	49%
Arginin-äthylester	0%	0%	17%	22%

10. Harnstoffbildung aus Benzoyl-l-arginin-amid.

M/10 BAA-chlorhydrat	4 ccm	M/10 Agmatin-chlorhydrat	4 ccm
M/10 Na ₂ CO ₃	2 ccm	M/10 NaOH	2 ccm
Wasser	4 ccm	Wasser	4 ccm
M/100 MnSO ₄	2 ccm	M/100 MnSO ₄	2 ccm
M/10 Glykokoll-NaOH	4 ccm	M/10 Glykokoll-NaOH	4 ccm
Coli-Suspension	4 ccm	Coli-Suspension	4 ccm

TABELLE XVI.

PH 9, mit Mn	nach 1 Stde	nach 2 Stdn
Agmatin	9%	18%
Benzoyl-arginin-amid	0%	0%

Bei diesem Versuch wurde die Probe nach der pH -Umstellung zu 7 erhitzt, um die Coli-Agmatinase zu inaktivieren. Die Abspaltung des Amido-Ammoniaks aus Benzoyl-arginin-amid war in jener 2 stündigen Versuchsprobe 4%, mittels Ureaseverfahrens konnte aber keine Harnstoffbildung bewiesen werden.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Agmatin wird durch Arginase und Heteroarginase nicht gespalten. *Bacillus coli communis* kann es aber zu Harnstoff und Putreszin abbauen. Dieses Ferment wurde Agmatinase genannt.

2. Agmatinase spaltet auch noch Oxybutylguanidin und Arcain auf.

3. Agmatinase kommt auch in Kaninchenleber vor.

4. Weder Arginase noch Heteroarginase kann das Agmatin, Oxybutylarginin und Arcain aufspalten.

5. Heteroarginase kann ausser aus Kaninchendarmschleimhaut noch aus Hühnerniere hergestellt werden. Dieses Ferment spaltet *d*(-)-Arginin, *l*-Argininsäure, Acetyl- und Benzoyl-*l*-Arginin, Carbamino-*l*-arginin und noch Guanidino-Valeriansäure. Es ist aber auf *l*(+)-Arginin und auf die Substrate der Agmatinase unwirksam.

6. *l*-Arginin-hydantoin, *l*-Argininester und Benzoyl-*l*-argininamid sind resistent gegen Arginase, Heteroarginase und Agmatinase.

7. Strenge Spezifität der Arginase, Heteroarginase und Agmatinase ist anzunehmen. Sie bezieht sich auf die chemische Konstitution der Guanidino-Verbindungen.

Diese Untersuchungen wurden unter Leitung von Prof. Akamatsu auf Kosten der Beihilfe ausgeführt, die Herrn Professor Akamatsu für wissenschaftliche Forschungen vom japanischen Unterrichtsministerium zur Verfügung gestellt wurde.

LITERATUR.

Ackermann, D., Engeland, R. u. Kutscher, Fr. (1911): Z. Biol., 57, 179.

Baldwin, E. (1914): Biochem. J., 28, 1155.

- Bergmann, M., Fruton, J. S. u. Pollok, H. (1939): J. biol. Chem., **127**, 643.
- Bergmann, M. u. Zervas, L. (1927): Z. physiol. Chem., **172**, 277.
- Boon, W. R. u. Robson, W. (1935): J. Biochem., **29**, 2573.
- Calvery, H. O. u. Block, W. D. (1934): J. biol. Chem., **107**, 155.
- Edlbacher, S. u. Bonem, P. (1925): Z. physiol. Chem., **145**, 69.
- Edlbacher, S. u. Burchard, H. (1930): Z. physiol. Chem., **194**, 69.
- Felix, K. u. Dirr, K. (1928): Z. physiol. Chem., **176**, 29.
- Felix, K., Müller, H. u. Dirr, K. (1928): Z. physiol. Chem., **178**, 192.
- Felix, K. u. Schneider, H. (1938): Z. physiol. Chem., **255**, 132.
- Fischer, E. u. Suzuki, U. (1905): Ber. chem. Ges., **38**, 4173.
- Gale, E. F. (1941): Biochem. J., **34**, 392.
- Hentzschel, W. u. Wislicenus, J. (1893): Ann. Chem., **275**, 312.
- Hellermann, L. u. Stock, C. (1938): J. biol. Chem., **125**, 771.
- Hino, S. (1924): Z. physiol. Chem., **133**, 110.
- Hunter, A. (1938): Biochem. J., **32**, 826.
- Kapfhammer, J. u. Müller, H. (1934): Z. physiol. Chem., **225**, 1.
- Kiesel, A. (1922): Z. physiol. Chem., **118**, 277 u. 284.
- Kitagawa, M. u. Eguchi, Y. (1938): Bull. agric. chem. Soc. Japan, **14**, 43.
- Poller, K. (1927): Z. Biol., **86**, 309.
- Richards, M. M. u. Hellermann, L. (1940): J. biol. Chem., **134**, 237.
- Sano, M. (1941): J. Biochem., **33**, 467.
- Sendyu, Y. (1925): J. Biochem., **5**, 229.
- Stieglitz, J. u. McKee, R. H. (1900): Ber. chem. Ges., **33**, 1517.
- Sugino, K. u. Kanayama, M. (1940): J. Electrochem. Assoc. Japan, **8**, 250.
- van Slyke, D. D. u. Cullen, G. E. (1914): J. biol. Chem., **19**, 211.
- Wallach, O. (1900): Ann. Chem., **312**, 171.



ÜBER DIE VERTEILUNG DES KRYPTOXANTHINS IN PFLANZLICHEN GEWEBEN. II.¹⁾

VON

MASANOBU AJISAKA.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Kitasato-Instituts
zu Tokyo. Direktor: Dr. A. Fujita.)

(Eingegangen am 26. September 1942)

Die Ergebnisse der weiteren Untersuchungen über die Verteilung des Kryptoxanthins und der Carotine in pflanzlichen Geweben werden in Tabelle I angeführt. Wie in der vorangehenden Arbeit gezeigt wurde (Ajisaka 1942), machen Carotine in vielen grünen Blättern, Wurzeln und Früchten wie auch hier das hauptsächlichste Provitamin A aus, während bei Kaki der Gehalt an Kryptoxanthin 2 bis 4 mal so gross wie der an Carotin ist. Bei Bohnen ist der Gehalt der Provitamine A im Gehäuse viel grösser als in den Samen.

Herrn Dr. A. Fujita bin ich für die freundliche Leitung bei dieser Arbeit zu bestem Dank verpflichtet.

LITERATUR.

Ajisa ka (1942): J. Biochem. **36**, 101.

¹⁾ Der Gesellschaft „Nippon Gakusyutu-Sinkôkai“ danke ich ergebenst für die Unterstützung dieser Arbeit (A. Fujita).

TABELLE I.

Datum	Art	Gewebe	Provitamin A-Gehalt in mg%		Car. Krypt.	a-Car. Gesamtcar. (%)
			Car.	Krypt.		
28. Sept. 1942	<i>Allium fistulosum</i> L. (Negi)	Blatt (Grüner Teil)	1,05	0,017	62	6
28. Sept. "	<i>Allium odorum</i> L. (Nira)	Blatt	5,60	0,05	112	5
22. Sept. "	<i>Zingiber officinale</i> Rosc. (Syōga)	Wurzel	0,067	—	—	—
12. Okt. "	<i>Perilla frutescens</i> Brit. var. <i>crispa</i> Decne. (Akasiso)	Frucht	1,47	0,06	24,5	5
15. Sept. "	<i>Solanum Melongena</i> L. var. <i>esculentum</i> Nees. (Nasu)	Frucht { Epicarp { Meso- u. { Endocarp	0,26 0	0,014 0	12,1 —	6 —
20. Sept. "	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. (Soyaingen)	Hülse { Gehäus- { Samen	0,24 0	0,028 0	8 —	17 —
18. Sept. "	<i>Glycine Max</i> Merrill. (Edamame)	Hülse { Gehäuse { Samen	0,35 0,04	0,015 0,005	13 8	4 —
16. Sept. "	<i>Pyrus Simonii</i> Carr. (Nasi: „Tyōzyūrō“)	Fruchtschale (braungelb)	0,02	0,006	3,3	—
16. Sept. "	<i>Pyrus Simonii</i> Carr. (Nasi: „Nizisseiki“)	(grüngelb) Frucht	0,06	0,005	12	—
7. Okt. "	<i>Diospyros Kaki</i> Thunb. (Kaki: „Denzirō“)	{ Schale { Fleisch	1,68 0,12	4,06 0,49	0,414 0,245	18 17
26. Sept. "	<i>Laminaria japonica</i> Areschoug (Konbu)	Blatt	0,31	0	—	5
26. Sept. "	<i>Undaria pinnatifida</i> Suringar (Wakame)	"	0	0	—	—

ÜBER DIE KONSTITUTION DES OPHIDINS, EINES N-HALTIGEN EXTRAKTIVSTOFFES DER SCHLANGENMUSKEL.

VON

KAZUO KENDO.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität
zu Taihoku. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 8. Oktober 1942)

Im vorigen Jahre ist eine Mitteilung von H. Imamura (1939) aus diesem Institut erschienen, in der er über seine sich auf die Extraktivstoffe der Schlangennuskeln beziehenden Versuche berichtet, und eine bisher unbekannte Substanz angibt. Er stellte für diese neue Verbindung auf Grund der Analyse ihres Pikrolonates die empirische Formel $C_{10}H_{16}N_4O_4$ auf. Diese Substanz wurde von Herrn Prof. Tomita nach dem Orte ihrer ersten Feststellung als „Ophidin“ bezeichnet. Herr Prof. Tomita übergab mir weitere Untersuchungen über die Konstitution dieses Körpers.

Unter Anwendung der von Kutscher bei der Untersuchung von Liebig's Fleischextrakt und in vielen anderen Fällen verwandten Methodik bei den Kobramuskeln stiessen wir auf diese Substanz zuerst in der Lysinfraktion. Hier war sie mit alkoholischer Pikrolonsäure fällbar und liess sich in Form ihres Pikrolonates, Pikrates oder in freier Form isolieren.

Entgegen der Angabe von Imamura (1939) glaubte ich aus meinen Analysenwerten des freien Körpers und mehrerer Salze die Formel $C_{10}H_{16}N_4O_3$ ableiten zu können. Das Ophidin ist rechtsdrehend, gibt eine Ninhydrinreaktion und lässt sich mit einer Reihe bekannter Alkaloidfällungsmittel niederschlagen. Pauly's Diazoreaktion fällt schwach positiv aus.

Hinsichtlich ihrer Konstitution liess sich von vornherein aus der Tatsache, dass das Ophidin ein Kupfersalz bildet, auf das Vorhandensein einer Carboxylgruppe schliessen. Weiter ergab die Untersuchung mit Hilfe der van Slyke'schen Methode eine Amino-

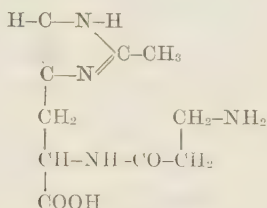
gruppe. Eine aliphatische Doppelbindung konnte durch das Ausbleiben der Entfärbung von Permanganatlösung ausgeschlossen werden.

Es wurden nun Versuche eines Abbaus durchgeführt. Wir hofften zunächst, auf dem Wege der Barytspaltung oder der Hydrolyse mit Bromwasserstoffsäure Aufschluss über die Konstitution des Ophidins zu erhalten. In der Tat gelang die Isolierung des erwarteten Methylhistidins in Form des Pikrates, Pikrolonates und Nitrates, sowie die Isolierung des β -Alanins in Form der freien Säure oder als α -Naphthylisocyanatverbindung. Der als Methylhistidin angesprochene Körper gab nicht nur die erwarteten Analysenzahlen, sondern zeigt naturgemäss ebenso wie beim Ophidin selbst eine ganz schwache Diazoreaktion nach Pauly. Bei der Spaltung des Ophidins mit gebrannten Kalk gelang die Abspaltung einer Base, die sich als 2-Methylimidazol identifizieren liess. Damit war nicht nur ein Imidazolring, sondern auch der Ort der Methylgruppe festgelegt. Die Identität des von Pyman (1910) synthetisch dargestellten 2-Methylimidazols mit dem beim Abbau des Ophidins erhaltenen Produkt beweist, dass die durch Abbauversuche gewonnene Vorstellung über die Konstitution des Ophidins richtig ist.

Schon bevor dieser Abbau gelang, war vermutet worden, dass das Ophidin, dessen Formel sich nur durch ein Mehr von CH_3 von der des Carnosins unterscheidet, ein einfach methyliertes Carnosin und ein Isomer des Anserins sei; und ein sehr schwacher, doch positiver Ausfall der Pauly'schen Diazoreaktion beim Ophidin legte schon damals den Gedanken nahe, dass diese Methylgruppe im Gegensatz zu Anserin nicht für den Wasserstoff der Imidogruppe des Imidazols eingetreten sei. Die Ähnlichkeit zwischen Ophidin, Carnosin und Anserin verschiedenen Fällungsmitteln gegenüber machten die Auffassung des Ophidins als Monomethylcarnosin wahrscheinlich. Als nun schliesslich die Abspaltung eines methylierten Imidazolrings aus dem Ophidin auf dem geschilderten Wege gelang, war ein weiteres, wesentliches Beweisstück für die Richtigkeit der vermuteten Formel erbracht.

Über die Reihenfolge, in der die Sprengstücke— β -Alanin und

Methylhistidin—in Ophidin angeordnet sind, ist noch nichts zu sagen. Immerhin ist es nach Analogie mit dem Carnosin und Anserin in hohem Masse wahrscheinlich, dass die Carboxylgruppe des β -Alanins an die Aminogruppe des Methylhistidins getreten ist. Dementsprechend ist die Konstitution des Ophidins die folgende:



VERSUCHSTEILE.

1. Darstellung des Ausgangsmaterials.

Das zur Verarbeitung kommende Ophidin wurde aus Kobramuskeln dargestellt. Ich lehne mich dabei ziemlich eng an das von H. Imamura (1939) ausgearbeitete Verfahren der Ophidindarstellung an, nur zog ich es vor, anstatt, wie er es getan hat, einzelne Basenfraktionen zu trennen, nur das Ophidin allein darzustellen. Es wurde einzelnen wie folgt verfahren:

Der Wasserextrakt der Kobramuskeln wurde zunächst durch Hitzekoagulation und dann mit Tannin-Blei-Methode vollständig enteiweisst. Das Filtrat wurde nach dem Beseitigen des Bleies so weit eingeeengt, bis sich das Taurin ausscheidet. Man engt das Filtrat ein und fällt in schwefelsaurer Lösung mit Phosphorwolframsäure. Diese Fällung wurde in üblicher Weise mit Baryt zerlegt und in eine Lösung der kohlensauen Basen übergeführt. Diese Basenlösung wurde mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung versetzt. Dabei schieden sich reichliche Krystalle aus. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren bekommt man ein Pikrolonat, welches bei 232° (unkorr.) schmilzt.

Nach dieser Methode wurden aus 40 kg Kobramuskeln 35 g Ophidinpikrolonat erhalten. Es ergaben folgende Analysendaten:

4,125 mg Subst.	6,920 mg CO ₂ ,	1,835 mg H ₂ O.
3,915 mg "	6,585 mg "	1,700 mg
3,615 mg "	6,060 mg "	1,600 mg
2,590 mg "	0,473 ccm N ₂ (25°, 750 mm)	
3,100 mg "	0,593 ccm N ₂ (28,5°, 759 mm)	
3,775 mg "	0,666 ccm N ₂ (16,5°, 774 mm)	

Ber. für C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₈ ·C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₅ + H ₂ O:	C 45,97%	H 4,98%	N 21,45%
	45,75 "	4,98 "	20,92 "
Gefunden:	45,87 "	4,86 "	21,63 "
	45,72 "	4,95 "	21,18 "

Zur Bestimmung der Pikrolonsäure und zugleich des Aminostickstoffes wurde das gewogene Pikrolonat mit Schwefelsäure zerlegt, und mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde abgedampft und gewogen.

0,2500 g Pikrolonat gaben 0,1265 g Pikrolonsäure

Ber. für C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₈ ·C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₅ + H ₂ O:	Pikrolonsäure 50,57%
Gefunden:	" 50,60 "

Die wässrige Lösung wurde in üblicher Weise auf Aminostickstoff-Ermittlung verarbeitet. Aus 0,2500 g des Pikrolonates resultieren nach der Berechnung 0,1149 g freie Substanz, welche 13,7 ccm N₂ bei 28° und 766 mm ergab.

Ber. für C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O ₃ (NH ₂):	Amino-N 6,60%
Gefunden:	" 6,56 "

Eine wässrige Lösung des Ophidins reagiert alkalisch, zeigt eine starke Ninhydrin- und eine ganz schwache Diazoreaktion nach Pauly.

Hatte man das Ophidinpikrolonat in siedendem Wasser aufgelöst, mit Schwefelsäure im Überschuss versetzt und abgekühlt, so schied sich sofort die Pikrolonsäure aus. Das gelbe Filtrat wurde durch Ätherextraktion von Pikrolonsäure befreit und die farblose, schwefelsaure Lösung mit Barytwasser von der Schwefelsäure quantitativ entfernt. Darauf schied sich nach dem Einengen des Filtrates das freie Ophidin ab, welches bei 249° schmilzt.

3,920 mg Subst.:	6,970 mg CO ₂ ,	2,435 mg H ₂ O.
3,290 mg "	0,660 ccm N ₂ (26°, 758 mm)	

Ber. für C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₈ + $\frac{1}{2}$ H ₂ O:	C 48,19%	H 6,82%	N 22,49%
Gefunden:	48,49 "	6,95 "	22,84 "

Die Elementaranalyse führte zur Aufstellung der Formel $C_{10}H_{16}N_4O_3$, die mit der vom Pikrolonat her erwarteten übereinstimmt.

Das spezifische Drehungsvermögen im Wasser beträgt bei einer 1,43%igen Lösung $[\alpha]_D^{20} = +41,26^\circ$.

Das Ophidin bildet ein Dipikrat von der Formel $C_{10}H_{16}N_4O_3 \cdot (C_6H_3N_3O_7)_2 + H_2O$, das einen Schmelzpunkt von 155° besitzt.

Wird eine wässrige Lösung des freien Ophidins mit Pikrinsäurelösung versetzt und im Eisschrank stehen gelassen, so scheiden sich daraus allmählich gelbliche, nadelförmige Krystalle aus, die scharf bei 155° schmelzen.

3,480 mg Subst.: 4,670 mg CO_2 , 1,00 mg H_2O

3,650 mg " 0,581 ccm N_2 (13° , 766 mm)

Ber. für $C_{10}H_{16}N_4O_3 \cdot (C_6H_3N_3O_7)_2 + H_2O$: C 36,87% H 3,35% N 19,55%

Gefunden: 36,60 " 3,22 " 19,15 "

Um in die Lage zu kommen, die Frage zu einem Abschluss zu bringen, ob das Ophidin eine Carboxylgruppe hat, habe ich das Kupfersalz dargestellt und die Kupferbestimmung ausgeführt. 0,6 g des freien Ophidins wurden in wenig Wasser gelöst, mit Kupfercarbonat auf dem Sandbad gekocht. Das tiefblaue Filtrat wurde eingeeengt und unter Zusatz von absolutem Alkohol im Exsiccator allmählich verdunstet. Dabei schieden sich tiefblaue Krystalle in Tafeln ab, die bei 210° schmolzen.

3,120 mg Subst.: 4,100 mg CO_2 , 1,460 mg H_2O

3,030 mg " 0,412 ccm N_2 (13° , 767 mm)

Ber. für $C_{10}H_{16}N_4O_3 \cdot CuO + H_2O$: C 35,55% H 5,33% N 16,59%

Gefunden: 35,83 " 5,24 " 16,38 "

Bezüglich des Kupfersalzes des Ophidins habe ich eine Besonderheit gefunden, die mir vielleicht auch bei dem Carnosin und Anserin begegnet ist. Beim Erhitzen des Ophidins in wässriger Lösung mit Kupfercarbonat verbindet sich das Kupferoxyd mit dem Ophidin unter Kohlensäureentwicklung. Es erscheint mir sehr wahrscheinlich, dass sich das Kupferatom einerseits mit der Carboxylgruppe des Methylhistidins und andererseits unter Vermittelung des Sauerstoffatoms mit dem Carbonylkohlenstoff des β -Alanins verkettet, sodass das Ophidinkupfer unter Vereinigung

des Ophidins mit Kupferoxyd in einem monomolekularen Verhältnis gebildet ist.

Aus den oben geschilderten Analysenwerten des freien Körpers und verschiedener Salze glaube ich für das Ophidin die Formel $C_{10}H_{16}N_4O_3$ ableiten zu können, welche der Anserinformel genau entspricht.

Das Aussehen, Verhalten gegen Lösungsmittel und die Fällungsreaktionen des Ophidins und Anserins zeigen eine Ähnlichkeit, während der Schmelzpunkt der Pikrolonate, Pikrate, Kupfersalze sowie auch der freien Basen ungleich ist.

Um einen Vergleich des Ophidins mit dem Anserin (1929) sowie dem Carnosin (1907–1911) zu erleichtern, stellte ich die Eigenschaften dieser Verbindungen tabellarisch zusammen.

TABELLE I.

Eigenschaften	Extraktivstoffe		
	Ophidin	Anserin	Carnosin
Schmelzpunkt			
Pikrolonat	232°	251°	163°
Pikrat	155°	205°	224°
Cu-Salz	210°	230°	220°
Freie Subst.	249°	238°	248°
Paulys Diazo-R.	+	—	++
Ninhydrin-R.	++	++	++
$[\alpha]_D^{20}$	+41,26°	+11,26°	+25,0°

2. Spaltungsversuche des Ophidins.

Nachdem ein fester Boden für die Erforschung der Konstitution des Ophidins durch eine Sicherstellung seiner Formel gewonnen war, habe ich den Beweis der Konstitution durch die Spaltung zu stützen versucht.

A. Barytspaltung des Ophidins.

5 g der freien Substanz wurden 6 Stunden lang mit 60 ccm Wasser und 40 g Bariumhydroxyd in eingeschmolzenem Rohr bei 140° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die abfiltrierte Lösung zuerst mit Schwefelsäure und dann mit Kohlensäure behandelt.

Die regenerierte kohleensaure Lösung reagiert alkalisch, zeigt eine starke Ninhydrin- und eine ganz schwache Pauly'sche Diazo-reaktion. Wenn man dem eingeeengten Filtrat alkoholische Pikrinsäurelösung zugesetzt hat, so schieden sich sofort 4.0 g Krystalle in gelben Prismen aus, die in Wasser und Alkohol schwer löslich sind und bei 195° schmolzen.

3,750 mg Subst.: 5,110 mg CO₂, 1,320 mg H₂O.

3,155 mg " 0,563 ccm N₂ (29°, 755 mm).

Ber. für C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂ ·C ₆ H ₃ N ₃ O ₇ + H ₂ O:	C 37,50%	H 3,83%	N 20,19%
Gefunden:	37,16 "	3,94 "	20,04 "

Um das Pikrat in Pikrolonat zu verwandeln, habe ich das Pikrat mit Schwefelsäure zersetzt, die Pikrinsäure mit Äther beseitigt, die farblose schwefelsaure Lösung mit Baryt behandelt und den Barytüberschuss mit Kohlensäure entfernt. Wurde die regenerierte Basenflüssigkeit mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung versetzt, so schieden sich sofort schöne gelbliche Krystalle, die bei 222° schmolzen und nach 6 stündigen Trocknen in vacuo bei 110° zur Analyse kamen.

3,760 mg Subst.: 6,440 mg CO₂, 1,470 mg H₂O.

2,395 mg " 0,485 ccm N₂ (30°, 762 mm).

Ber. für C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂ ·C ₁₀ H ₅ N ₄ O ₅ :	C 47,11%	H 4,38%	N 22,63%
Gefunden:	46,71 "	4,37 "	22,87 "

Beim Einengen und Abkühlen der aus Pikrat oder Pikrolonat freigemachten Basenlösung schied sich eine bei 230° schmelzende Substanz aus, die eine starke Ninhydrin- und eine ganz schwache Pauly'sche Diazoreaktion zeigt. Wegen ihres zu hygroskopischen Charakters konnte sie nicht analysiert werden. Mit verdünnter Salpetersäure eingedampft, lieferte sie ein krystallisiertes Nitrat in farblosen, durchsichtigen Prismen, die bei 220° schmelzen. Bei der Analyse ergab die in vacuo bei 120° getrocknete Substanz 23,85%N, statt der für Methylhistidin-dinitrat berechneten 23,70%N.

Die Analysenwerte des Pikrates, Pikrolonates und Nitrates stimmen also zu denen für das Methylhistidin berechneten.

Somit kann also an der Bildung von Methylhistidin bei der Barytspaltung des Ophidins kein Zweifel sein.

Als man das Methylhistidin in dem Hydrolysat als Pikrat vollständig auskrystallisieren liess, konnte ein anderes Spaltungsprodukt aus dem Filtrat des Methylhistidinpikrates ausgeschieden werden. Das Filtrat wurde nun mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Die von Pikrinsäure befreite wässrige Lösung wurde mit Baryt und dann Kohlensäure behandelt. Das Filtrat, das amphoter reagiert und nicht eine Pauly'sche Diazoreaktion sondern eine starke Ninhydrinreaktion zeigt, wurde nach dem Einengen mit 10 ccm *n*-Natronlauge und 2 g α -Naphthylisocyanat geschüttelt. Hatte man das Filtrat mit Salzsäure versetzt, so fiel α -Naphthylisocyanat des β -Alanins aus, das nach dreimaligem Umkrystallisieren aus heissem Alkohol in schneeweissen, rechteckigen Täfelchen vom Schmelzpunkt 234° auskrystallisierte. Zur Analyse wurde es im Vacuum bei 110° 6 Stunden lang getrocknet.

3,715 mg Subst.: 8,860 mg CO_2 , 1,790 mg H_2O .

3,260 mg " 0,316 ccm N_2 (29° , 763 mm).

Ber. für $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_2 \cdot \text{C}_4\text{H}_7\text{NO}$: C 65,11% H 5,42% N 10,90%

Gefunden: 65,04 " 5,39 " 11,00 "

Nun gelang die Isolierung des erwarteten β -Alanins nach Neuberg und Manasse (1907) als α -Naphthylisocyanat-Verbindung bei der Barytspaltung des Ophidins.

Zieht man nun die erwähnten Tatsachen in Betracht, so unterliegt es keinem Zweifel, dass sich das Ophidin beim Kochen mit Baryt unter Bildung von Methylhistidin und β -Alanin zersetzt.

B. Spaltung des Ophidins mit Bromwasserstoffsäure.

5 g Ophidin wurden mit 50 ccm 24% iger Bromwasserstoffsäure unter Rückflusskühlung auf dem Sandbad 5 Stunden lang zu gelindem Sieden erhitzt; die überschüssige Bromwasserstoffsäure wurde durch wiederholtes Abdampfen unter vermindertem Druck grösstenteils vertrieben. Der Rest dieser Säure wurde zunächst mit Ammoniak als Bromammon und dann mit frisch gefälltem Silberoxyd als Bromsilber beseitigt. Man hat das Filtrat mit H_2S behandelt und im Vacuum zu Sirup eingengt und im Exsiccator getrocknet. Nach einigen Tagen schieden sich daraus farblose, blätterartige Krystalle aus, die bei 195° schmolzen, wie das von Weygand (1941) hergestellte β -Alanin.

3,710 mg Subst.: 5,450 mg CO₂, 2,600 mg H₂O.

2,095 mg " 0,287 ccm N₂ (25°, 763 mm).

Ber. für C₈H₇NO₂: C 40,45% H 7,86% N 15,73%

Gefunden: 40,06 " 7,84 " 15,75 "

Somit ist mit Sicherheit erwiesen, dass beim Erhitzen mit Bromwasserstoffsäure sich das Ophidin unter Bildung von β -Alanin zersetzt.

Es sei hier gleich hervorgehoben, dass sämtlich Versuche, Methyl-histidin als solches unter den durch IIBr erhaltenen Spaltungsprodukten des Ophidins zu isolieren, gänzlich negative Resultate ergaben.

3. Über die Stellung der Methylgruppe in Imidazolkern des Ophidins.

Es war von vornherein vermutet worden, dass die Methylgruppe nicht für den Wasserstoff der Imidogruppe des Imidazols eingetreten sei, weil die Pauly's Diazoreaktion sowohl beim Ophidin wie auch beim durch Barytspaltung gebildeten Methylhistidin positiv ausfiel. Dass der Körper, dessen Methylgruppe, wie es beim Anserin der Fall ist, an dem Iminostickstoff des Imidazolkerns verkettet ist, keine Pauly'sche Diazoreaktion zeigt, hat vor mehreren Jahren H. Fischer (1909) konstatiert.

Der positive Ausfall der Pauly'schen Diazoreaktion bei dem Ophidin deutet also darauf hin, dass eine Methylgruppe für den Wasserstoff der Methingruppe entweder in der 2. oder in der 5. Stellung des Imidazolkerns eingetreten ist. Eine Entscheidung darüber, ob eine von den beiden Bindungsstellen der Methylgruppe die richtige ist, war eine der wichtigsten und zweckmässigsten Aufgaben zur Konstitutionsermittlung des Ophidins.

Nach vielen Bemühungen gelang schliesslich die erwartete Abspaltung des Ophidins; es wurde nämlich die mit gebranntem Kalk vermischte Substanz erhitzt und in einer *n*-HCl-Vorlage destilliert.

2,0 g Ophidin wurden mit 40,0 g gebranntem CaO vermischt, in einer Retorte auf Drahtnetz mit direkter Flamme erhitzt. Dabei entwickelte sich zugleich Gasdampf und ein schweres, stark

basisches Destillat, das an den Wänden des Gefäßes herabfloss und in *n*-HCl aufgenommen wurde. Das in *n*-HCl übergegangene Destillat wurde in Vacuum stark eingengt und mit Alkohol versetzt. Hat man nun dem Filtrat, das von dem ausgeschiedenen Chlorammon abfiltriert wurde, eine alkoholische Goldchloridlösung zugesetzt und das Gemisch im Eisschrank stehen gelassen, so schied sich allmählich gelbrotes Chloraurat aus, das bei 200° schmolz.

Um das Aurat in Pikrat zu verwandeln, habe ich das Goldchloridsalz mit Schwefelwasserstoff zerlegt, mit frisch gefälltem Silberoxyd von Salzsäure befreit und wieder mit Schwefelwasserstoff entsilbert. Wurde nun die regenerierte Basenflüssigkeit mit alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt, so schieden sich schöne gelbliche nadelförmige Krystalle aus, die bei 213° schmolzen, genau so wie nach Pyman's Angabe bei 2-Methylimidazol. Dass die Substanz aus Methylimidazol bestand, geht aus folgenden Analysenwerten hervor.

3,560 mg Subst.: 4,850 mg CO₂, 0,980 mg H₂O.

2,900 mg " 0,512 ccm N₂ (13°, 770 mm).

Ber. für C₄H₆N₂·C₆H₃N₃O₇+H₂O: C 36,47% H 3,34% N 21,27%

Gefunden: 37,16 " 3,08 " 21,35 "

Für Identifizierung der beiden Methylimidazole ist der Schmelzpunkt der Pikrate sehr geeignet. Das Pikrat des 5-Methylimidazols schmilzt bei 160°, während der Schmelzpunkt des 2-Methylimidazolpikrates viel höher liegt, es schmilzt nämlich bei 213°.

Um einen Vergleich beider Methylimidazole zu erleichtern, wird der Schmelzpunkt verschiedener Salze beider Körper im folgenden kurz zusammengestellt:

Salze	Schmelzpunkt von	
	2-Methylimidazol	5-Methylimidazol
Chloraurat	200°	200–201°
Nitrat	154°	110°
Pikrat	213°	160–162°

Nachdem auf diese Weise die aliphatische Seitenkette des Ophidins abgespalten war, konnte freies Methylimidazol dargestellt

werden, das alle Eigenschaften eines von Pyman synthetisch dargestellten 2-Methylimidazols charakterisiert.

Alle bisher bekannten Tatsachen sind aufs beste mit der Annahme eines 2-Methylimidazolrings im Methylhistidin vereinbar. Damit ist die Natur des N-haltigen Ringsystems im Ophidin aufgeklärt und die Frage nach der Konstitution dieses Körpers bis auf die Stellung der Methylgruppe erledigt.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Im Übereinstimmung mit der Angabe von Imamura (1939) konnte aus Kobramuskeln eine neue Base isoliert werden, deren Pikrolonat bei 232° schmilzt. Die Base hat eine Carboxyl- und eine Aminogruppe, zeigt eine starke Ninhydrin- und eine schwache Pauly'sche Diazoreaktion.

2. Aus Analysenwerten des freien Körpers und mehrerer Salze wird für diesen Körper die Formel $C_{10}H_{16}N_4O_3$, also die summarische Anserinformel angenommen. Nach dem Orte seiner ersten Feststellung wird der Körper als Ophidin benannt.

3. Das Ophidin zersetzt sich beim Kochen mit Baryt unter Bildung von Methylhistidin und β -Alanin. Das hier erhaltene Methylhistidin unterscheidet sich in verschiedenen Eigenschaften von dem aus Anserinspaltung gebildeten N-Methylhistidin.

4. Durch Abspaltung der aliphatischen Seitenkette liefert das Ophidin beim Erhitzen mit gebranntem Kalk 2-Methylimidazol. Damit war nicht nur ein Imidazolring, sondern auch der Ort der Methylgruppe festgelegt und die Natur des N-haltigen Ringsystems im Ophidin aufgeklärt.

5. Nach Analogie mit dem Carnosin und Anserin wird für das Ophidin die Formel einer β -Alanyl-2-methyl-histidins zur Diskussion gestellt.

LITERATUR.

- Ackermann, D., Timpe, O. u. Poller, K. (1929): H-S. 183,
Gulewitsch, Wl. (1907): H-S. 50, 535.
" (1911): H-S. 73, 434.
Fischer, H. (1909): H-S. 60, 77.

Imamura, H. (1939): Diese Zs. **30**, 479.

Neuberg, C. u. Manasse (1907): H-S. **50**, 535.

Pyman (1910): Jl. of Chem. soc. (London) **98**, 1814.

Weygand, F. (1941): B. **74**, 256.

ÜBER EINE GÄRBESCHLEUNIGENDE WIRKUNG DER ZAHNPULPA.

VON

SHIZUKA MOTOMURA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität
zu Taihoku. Vorstand: Prof. Dr. Masaji Tomita.)

(Eingegangen am 8. Oktober 1942)

Seitdem es gezeigt wurde, dass die Vitamine den Prozess der alkoholischen Zuckerspaltung fördern, ist die Rolle vitaminhaltiger Stoffe aus dem Tier- und Pflanzenreich in sehr zahlreichen Arbeiten nach der gleichen Richtung hin untersucht worden, wobei vielfach positive Ergebnisse erzielt werden konnten.

Da nun ein grosses Material über chemisch-charakterisierte Stimulatoren der Gärung in den Arbeiten von Neuberg, Reinfurth und Sandberg (1921) und Tomita (1922) vorliegt, wobei es sich um Verbindungen meist einfacher Natur handelt, habe ich es für wünschenswert gehalten, auch ein bisher zu biochemischen Untersuchungen kaum berücksichtigte Tiergewebe, die Zahnpulpa heranzuziehen, das sie einen bedeutenden Einfluss auf die Odontogenie zu entfalten scheint.

Die unten beschriebenen Versuche berühren die Frage nach der Wirkung der Zahnpulpa auf die alkoholische Gärung. Es zeigt sich, dass die Zahnpulpa der jungen Schweine eine Gärbeschleunigung ausübt.

VERSUCHSTEILE.

Die frische Zahnpulpa, die durch Öffnen der Zähne von jungen Schweinen mittels geeigneter Instrumente erhalten wurde, wurde mit Wasser, Glycerin, Alkohol oder Aceton digeriert. Man versetzt das Digerat sofort oder nach der Hitzeoagulation mit Glukoselösung und Hayduck'scher Nährflüssigkeit, die mit Bierhefe gezüchtet wurde. Im einzelnen wurde in nachstehender Weise vorgegangen:

Versuch 1. 20,0 ccm Nährlösung mit Bierhefe wurden mit 3,0 ccm 5 proz. Traubenzuckerlösung und 10,0 ccm wässriger Lösung von Zahnpulpa (2,0 g frische Pulpa enthaltend) versetzt. Als Kontrolle diente ein pulpafreies System, das im übrigen die gleiche Zusammensetzung hatte.

TABELLE I.

Temperatur 28°	Zeiten nach					
Entwickelte CO ₂ (ccm)	45'	60'	75'	90'	105'	120'
in der Kontrolle	8,8	13,0	16,6	19,2	21,0	22,1
im Zahnpulpa-Ansatz	11,0	16,6	20,9	23,8	26,1	27,6
Beschleunigung gegen- über der Kontrolle	2,2	3,6	4,3	4,6	5,1	5,5

Versuch 2. Hierbei wurde dieselbe Anordnung gewählt, nur wurde das Digerat durch Erhitzen koaguliert. Zur Feststellung, dass der Effekt der Gärbeschleunigung nicht auf Fermentwirkung beruht, wurden 7 g Pulpa mit 35 ccm H₂O bei 0° einen Tag lang digeriert und dann erhitzt. Das Koagulat wurde abfiltriert. 10,0 ccm des Filtrates wurden als Gärgut angesetzt. Wie man aus Tabelle II ersieht, ist die Gärbeschleunigung noch vorhanden.

TABELLE II.

Temperatur 30,0°	Zeiten nach						
Entwickelte CO ₂ (ccm)	60'	70'	80'	90'	100'	110'	120'
in der Kontrolle	4,7	5,6	6,3	6,9	7,1	7,3	7,7
im Pulpa-Ansatz	3,8	5,4	7,1	9,0	12,8	14,8	16,1
Beschleunigung	-0,9	-0,2	0,8	2,1	5,7	7,5	8,4

Versuch 3. In diesem Versuche wurde folgendermassen verfahren: 20,0 ccm Nährlösung mit Bierhefe wurden mit 3,0 ccm 5% Glukoselösung und 10,0 ccm Glycerinextrakt der Pulpa versetzt, der durch Extraktion der frischen Zahnpulpa mit 5 facher Menge 50% Glycerins herzustellen ist.

Die Resultate sind in Tabelle III zusammengestellt.

TABELLE III.

Temperatur 30,5°	Zeiten nach					
Entwickelte CO ₂ (cem)	35'	75'	115'	155'	195'	235'
in der Kontrolle	0,3	1,8	3,7	7,3	11,0	13,7
im Pulpa-Ansatz	0,9	2,4	9,7	14,5	15,8	16,4
Beschleunigung	0,6	0,6	6,0	7,2	4,8	2,7

Versuch 4. 6,0 g Zahnpulpa von Schweinen hat man mit 45 g 50% Glycerins digeriert. Nach 1 tägigem Stehenlassen im Eisschrank wurde das Digerat erhitzt und vom Koagulat abfiltriert. 10,0 cem des Filtrates wurden mit 20,0 cem Nährlösung mit Bierhefe und 3,0 cem 5% Traubenzuckerlösung versetzt. Tabelle IV veranschaulicht die Resultate.

TABELLE IV.

Temperatur 28°	Zeiten nach							
Entwickelte CO ₂ (cem)	50'	60'	70'	80'	90'	100'	110'	120'
in der Kontrolle	0,7	0,8	0,8	1,0	0,4	0,4	0,0	0,1
im Pulpa-Ansatz	4,8	4,2	3,4	3,4	1,6	1,3	1,0	0,6
Beschleunigung	4,1	3,4	2,6	2,4	1,2	0,9	1,0	0,5

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, dass die Gärbeschleunigung durch Glycerinextrakt der Zahnpulpa deutlich nachgewiesen wird und dass der erhitzte Glycerinextrakt auch noch eine stimulierende Wirkung besitzt.

Eine weiteres Verfahren, das uns Einblick in den nicht fermentativen Effekt der Gärbeschleunigung gestattet, ist der Versuch mit Alkohol- und Acetonextrakt.

Zur Feststellung ob die gärbeschleunigenden Substanzen auch in beiden Solventien löslich sind, habe ich folgende Versuche angestellt.

Versuch 5. 10,0 g frische Zahnpulpa wurden mit 40,0 cem Alkohol vermischt und bei 0° 2 Tage lang stehen gelassen. 2,0 cem davon wurden mit 20,0 cem Nährlösung mit Bierhefe und 3,0 cem

5% Glukoselösung versetzt. Als Kontrolle setzt man der Nährlösung mit Hefe Glukoselösung und 2,0 ccm Alkohol zu.

Die Ergebnisse finden sich in Tabelle V zusammengestellt.

TABELLE V.

Temperatur 30,5°	Zeiten nach						
Entwickelte CO ₂ (ccm)	30'	50'	70'	90'	100'	110'	120'
in der Kontrolle	8,6	13,3	17,2	18,8	19,2	19,4	19,8
im Pulpa-Ansatz	9,1	14,9	18,6	25,8	26,6	27,4	28,2
Beschleunigung	0,5	1,6	1,4	7,0	7,4	8,0	8,4

Versuch 6. 10,0 g frische Zahnpulpa wurden mit 40,0 ccm Aceton vermischt und im Eisschrank stehen gelassen. Nach 2 Tagen wurde das Digerat filtriert. 2,0 ccm davon wurden mit 20,0 ccm Nährlösung mit Hefe und 3,0 ccm 5% Traubenzuckerlösung versetzt. Anstatt des Pulpaextraktes dienten 2,0 ccm Aceton als Kontrolle.

Die Resultate sind aus Tabelle VI zu ersehen.

TABELLE VI.

Temperatur 30,5°	Zeiten nach						
Entwickelte CO ₂ (ccm)	30'	45'	60'	75'	90'	105'	120'
in der Kontrolle	0,1	0,3	0,7	1,0	1,2	1,1	1,2
im Pulpa-Ansatz	0,6	0,9	1,4	2,3	2,0	2,1	2,7
Beschleunigung gegen- über der Kontrolle	0,5	0,6	0,7	1,3	0,8	1,0	1,5

Ein Mehrgebrauch von Alkohol und Aceton muss dabei vermieden werden. Wird der Alkohol oder das Aceton bei dem Versuche bis auf ein Drittel Volumen der Gärlösung zugesetzt, so hört die Kohlensäureentwicklung sofort auf.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Zahnpulpa junger Schweine hat eine gärbeschleunigende Kraft.

2. Die Wirkstoffe sind aus Wasser, Glycerin, Alkohol und Aceton extrahierbar. Sie sind thermostabil.

3. Ob die Wirkstoffe einheitlicher oder zusammengesetzter Natur sind, und worauf der Effekt der Gärbeschleunigung durch die Zahnpulpa beruht, ist noch nicht aufgeklärt.

LITERATUR.

Neuberg, C., Reinfurth, E. u. Sandberg, M. (1921): Biochem. Zs. **121**, 218.

Tomita, M. (1922): Biochem. Zs. **131**, 175.

ÜBER DEN EINFLUSS DES CARNOSINS UND OPHIDINS AUF DIE ALKOHOLISCHE GÄRUNG.

VON

SHIZUKA MOTOMURA.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität
zu Taihoku. Vorstand: Prof. Dr. Masa ji Tomita.)*

(Eingegangen am 8. Oktober 1942)

Die fortschreitende Erkenntnis enthüllt immer deutlicher, dass trotz tiefgreifender Unterschiede im Stoffwechsel von Pflanze und Tier in zahlreichen Punkten weitgehende Analogien bestehen. Das gilt namentlich für bestimmte prinzipielle Fragen des Kohlehydratumsatzes. Wir wissen jetzt, dass die Zellen aller Organismen in den wesentlichsten Zügen den Traubenzucker in der gleichen Weise zerlegen. Einmal konnte man einzellige Lebewesen, z. B. die Hefezelle, als Versuchsobjekt wählen und dann die gesamte, aus mehreren Zellen aufgebaute Organismenwelt. Für die bei Hefegärung sichergestellten Beobachtungen kann sich also ein entsprechendes Verhalten beim Muskelorganismus feststellen lassen.

Es sind mannigfache Bestandteile des pflanzlichen und tierischen Organismus bekannt, die zur Gruppe der Vitamine und Hormone gehören und anregend auf alkoholische Zuckerspaltungen einwirken.

Da nun eine Reihe von artspezifischen Muskelextraktstoffen aufgefunden worden ist, deren Wirkung noch unaufgeklärt ist und es sich um Verbindungen von Histidinderivaten handelt, habe ich es für wünschenswert gehalten, die Rolle des Carnosins und Ophidins auf die alkoholische Gärung zu prüfen.

Das Carnosin wurde nach dem Verfahren von Gulewitsch (1900) aus Rindermuskeln dargestellt. Durch die Freundlichkeit von Kendo in unserem Institut gelangte ich in den Besitz verschiedener Proben von Ophidin, welches von Imamura und Kendo (1939–1942) zum ersten Mal aus Schlangemuskeln darge-

stellt wurde. Beide Verbindungen wurden als solche verwendet und zwar derart, dass bestimmte Mengen davon zu Gäransätzen in fester Form hinzugefügt wurden.

EXPERIMENTELLE BELEGE.

A. Versuche mit Carnosin.

Es zeigte sich das Carnosin eine gärungsbeschleunigende Kraft äussern kann. Im einzelnen wurde in nachstehender Weise vorgegangen:

Versuch 1. 20,0 ccm Hayduck-Nährlösung mit Bierhefe wurden mit 3,0 ccm 5% Traubenzuckerlösung und 0,01 g festem Carnosin versetzt. Als Kontrolle diente ein carnosinfreies System, das im übrigen die gleiche Zusammensetzung hatte.

TABELLE I.

Temperatur 24,5°	Zeiten nach					
Entwickelte CO ₂ (ccm)	30'	35'	40'	45'	50'	55'
in der Kontrolle	0,7	0,6	0,8	1,4	1,9	2,2
im Carnosin-Ansatz	2,2	2,4	3,6	2,2	2,6	2,6
Beschleunigung gegen- über der Kontrolle	1,5	1,8	2,8	0,8	0,7	0,4

Versuch 2. Für diesen Versuch wurde dieselbe Anordnung gewählt, nur war der Carnosin-Ansatz doppelt so gross.

Tabelle II zeigt die Ergebnisse.

TABELLE II.

Temperatur 24,5°	Zeiten nach						
Entwickelte CO ₂ (ccm)	40'	45'	50'	55'	60'	65'	70'
in der Kontrolle	1,7	1,4	1,3	1,8	1,8	1,7	2,0
im Carnosin-Ansatz	1,9	2,2	2,7	3,0	2,6	1,9	2,1
Beschleunigung gegen- über der Kontrolle	0,2	0,8	1,4	1,2	0,8	0,2	0,1

Versuch 3. 20,0 ccm Nährlösung mit Bierhefe wurden mit 3,0 ccm 5% Traubenzuckerlösung und 0,03 g Carnosin versetzt.

Die Befunde sind in Tabelle III verzeichnet.

TABELLE III.

Temperatur 23,5°	Zeiten nach					
Entwickelte CO ₂ (ccm)	45'	50'	55'	65'	75'	85'
in der Kontrolle	1,5	1,4	1,4	1,1	1,3	0,9
im Carnosin-Ansatz	1,7	1,8	2,0	1,9	2,1	1,4
Beschleunigung gegen- über der Kontrolle	0,2	0,4	0,6	0,8	0,8	0,5

Versuch 4. Es wurde 0,05 g Carnosin angesetzt. Tabelle IV veranschaulicht die Resultate.

TABELLE IV.

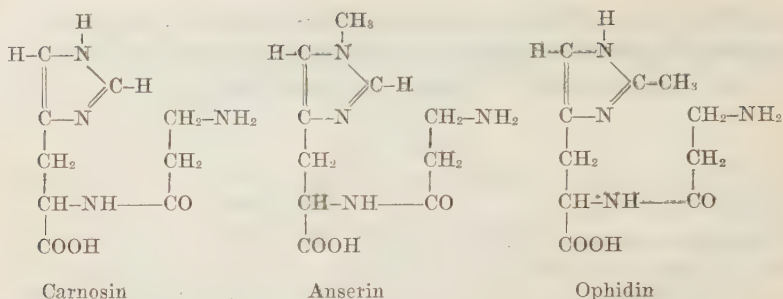
Temperatur 23,5°	Zeiten nach						
Entwickelte CO ₂ (ccm)	30'	35'	40'	45'	50'	55'	60'
in der Kontrolle	0,2	0,3	0,5	0,9	1,7	1,8	1,6
im Carnosin-Ansatz	2,1	1,7	1,6	2,2	2,5	2,3	2,0
Beschleunigung gegen- über der Kontrolle	1,9	1,4	1,1	1,3	0,8	0,5	0,4

Wie man sieht, ist die Gärbeschleunigung durch das Carnosin überall vorhanden, aber unter verschiedenen Bedingungen in ungleicher Stärke.

B. Versuche mit Ophidin.

Das Ophidin wurde als ein charakteristischer Bestandteil der Schlangengmuskeln in unserem Institut entdeckt. Seine Struktur wurde von Kendo (1942) festgestellt. Im Vergleich mit Carnosin und Anserin führe ich hier die von ihm aufgestellte Formel an.

Aus den Versuchen mit Ophidin ergibt sich, dass unter den von mir gewählten Bedingungen eine dem Carnosin ähnliche gärbeschleunigende Wirkung zu beobachten war.



Versuch 5. 20,0 ccm Nährlösung mit Bierhefe wurden mit 3,0 ccm 5% Glukoselösung und 0,01 g Ophidin versetzt. Unter Innehaltung identischer Bedingungen diente ein ophidinfreies System als Kontrolle.

Die Ergebnisse finden sich in Tabelle V.

TABELLE V.

Temperatur 24°	Zeiten nach			
Entwickelte CO ₂ (ccm)	60'	65'	70'	75'
in der Kontrolle	1,2	1,5	2,4	2,6
im Ophidin-Ansatz	1,6	2,1	3,2	2,9
Beschleunigung gegen- über der Kontrolle	0,4	0,6	0,8	0,3

Versuch 6. Bei diesem Versuche setzt man der Nährlösung 0,02 g Ophidin zu. Sonst wurde dieselbe Anordnung gewählt. Es ergab sich folgendes Resultat (vgl. Tabelle VI.).

TABELLE VI.

Temperatur 24,5°	Zeiten nach						
Entwickelte CO ₂ (ccm)	65'	70'	75'	80'	85'	90'	95'
in der Kontrolle	0,0	0,3	0,0	0,5	0,5	0,4	1,0
im Ophidin-Ansatz	0,6	0,8	1,4	2,3	2,1	2,0	2,9
Beschleunigung gegen- über der Kontrolle	0,6	0,5	1,4	1,8	1,6	1,6	1,9

Versuch 7. Versuchsanordnung wie vorher, nur war der Aktivator-Ansatz aus 0,03 g Ophidin bereitet worden.

Die Versuchsergebnisse waren folgende:

TABELLE VII.

Temperatur 24°	Zeiten nach						
Entwickelte CO ₂ (ccm)	80'	85'	90'	95'	100'	105'	1,2
in der Kontrolle	2,6	2,6	1,7	1,5	1,3	1,3	1,2
im Ophidin-Ansatz	2,8	2,8	2,3	2,0	1,8	1,7	1,3
Beschleunigung gegen- über der Kontrolle	0,2	0,2	0,6	0,5	0,5	0,4	0,1

Versuch 8. Bei diesem Versuche sind in dem Aktivator-Ansatz 0,05 g Ophidin enthalten. Tabelle VIII veranschaulicht die Befunde:

TABELLE VIII.

Temperatur 24,4°	Zeiten nach					
Entwickelte CO ₂ (ccm)	45'	50'	55'	60'	65'	70'
in der Kontrolle	0,4	0,4	0,7	1,5	2,2	2,9
im Ophidin-Ansatz	3,4	2,0	2,5	2,7	2,7	3,1
Beschleunigung gegen- über der Kontrolle	3,0	1,6	1,8	1,2	0,5	0,2

Bei Betrachtung obiger Tabellen (V. VI. VII. VIII.) offenbart es sich, dass auch das Ophidin eine gärbeschleunigende Wirkung hat.

LITERATUR.

- Gulewitsch, W. u. Admirazibi (1900): Zs. f. physiol. Chem. **30**, 565.
 Imamura, H. (1939): Diese Zs. **30**, 479.
 Kendo, K. (1942): Diese Zs. **36**, 265.

CHEMIE DER MEERSCHILDKRÖTEN.

I. Über die N-haltigen Extraktivstoffe der Muskeln von Meerschildkröten.

VON

HIROSHI TANAKA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Taihoku. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 8. Oktober 1942)

Seit langen Jahren haben sich Kutscher, Ackermann und ihre Mitarbeiter (1927) mit vergleichend-biochemischen Untersuchungen der Muskeln verschiedener Tierklassen beschäftigt und sind auf Grund einer ganzen Reihe von Versuchsergebnissen zu der Anschauung gekommen, dass man vom chemischen Standpunkt aus eine systematische Einteilung der Tierwelt durchführen könne. Wenn auch ihre Untersuchungen der Muskeln der verschiedenen Wirbeltiergruppen bisher eine ziemliche Übereinstimmung in bezug auf die Art der verschiedenen Extraktivstoffe ergeben haben, so blieb doch noch eine Lücke hinsichtlich einer besonderen Wirbeltiergruppe, die man als Sauropsiden (Vögel und Reptilien) zusammenzufassen pflegt. Diese Tiere nehmen ja auch durch die Form ihrer Stickstoffausscheidung eine Sonderstellung insofern ein, als nicht Harnstoff, sondern Harnsäure der Hauptträger des Stickstoffes in ihrem Harn ist. Man konnte danach vermuten, dass sich auch unter den basischen Extraktivstoffen der Sauropsidenmuskeln andere Substanzen finden liessen als bei den übrigen Wirbeltieren.

Diese Vermutung wurde bestätigt durch die Untersuchung von Ackermann und seiner Mitarbeiter (1929), die aus der Vogelmuskulatur eine bisher unbekannte Substanz, das Anserin isolierten. Unter den Reptilien sind die Schlangen auch Gegenstand eingehender Untersuchungen geworden. So haben Keil, Linnerweh und Poller (1927) aus den Pythonmuskeln γ -Butyrobetain gefunden. Später haben die Untersuchungen in unserem Institut (1939–

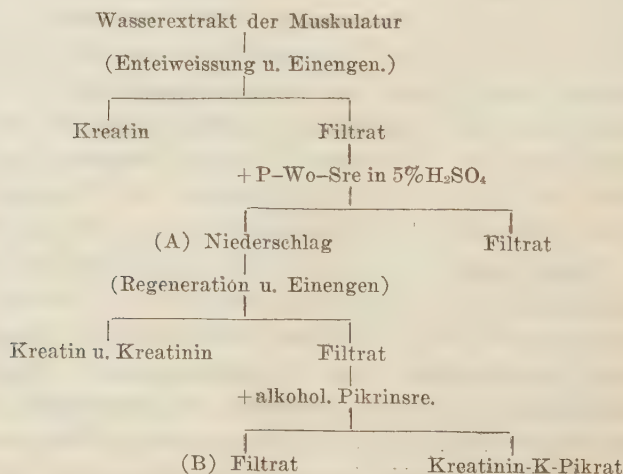
1942) als ein Bestandteil der Muskulatur von verschiedenen Schlangen eine neue Substanz von der summarischen Formel $C_{16}H_{16}N_4O_3$, das Ophidin ergeben.

Andere Reptilienarten, so z.B. die Schildkröten sind aber zur chemischen Untersuchung bisher kaum herangezogen. Um den Stamm der Chelonia in den Reptilien unserer vergleichend physiologisch-chemischen Untersuchungen zu ziehen, wählte ich als Ausgangsmaterial Dermochelys Schlegeli (German.) und Chelonia japonica (Thunb.), welche im hiesigen Meer lebendig gefangen wurden.

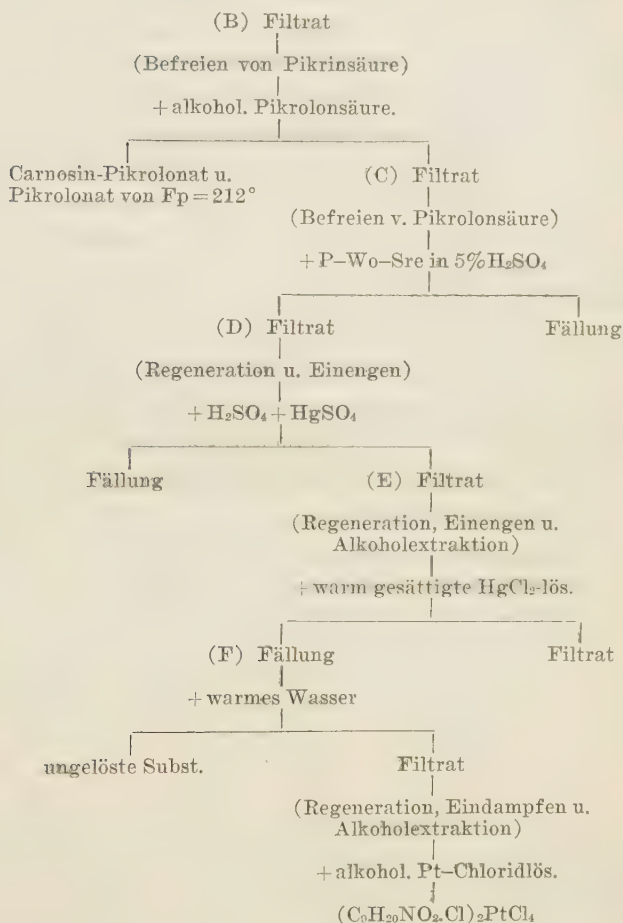
Der Wasserextrakt der Muskeln wurde zunächst enteiwesst und das Filtrat wurde so weit eingengt, bis das Kreatin sich ausscheidet. Man engt das Filtrat ein und fällt in schwefelsaurer Lösung mit Phosphorwolframsäure. Das Phosphorwolframat wurde mit Baryt zersetzt und die regenerierte Lösung eingengt, bis Kreatin und Kreatinin sich ausscheiden. Aus dem Filtrat wurden die gesuchten Extraktivstoffe als Pikrat oder Pikrolonat isoliert.

Die Isolierung der einzelnen Bestandteile wurde in den folgenden, schematisch dargestellten Ordnungen bearbeitet:

TABELLE I.



(Fortsetzung der Tabelle I)



A. Isolierung der N-haltigen Extraktstoffe aus der Muskulatur von *Dermochelys Schlegeli*.

Zur Verarbeitung kamen 18,3 kg Muskeln, welche frisch abpräpariert und mit einer Hackmaschine zerkleinert wurden. Nach viermaliger Extraktion mit kochendem Wasser wurde der Wassereextrakt zunächst durch Hitzekoagulation und dann durch die

Tannin-Blei-Methode vollständig enteiweisst. Das Filtrat wurde nach dem Beseitigen des Bleies so weit eingeeengt, bis das Kreatin sich ausschied. Gesamtausbeute des Kreatins betrug 35,5 g. Man engt das Filtrat ein und fällt in schwefelsaurer Lösung mit Phosphorwolframsäure. Die Phosphorwolframfällung (A) zersetzt man mit Baryt, beseitigt das überschüssige Baryt mit Kohlensäure und erhält so eine freie Lösung von kohlensauen Basen. Beim Einengen dieser Lösung bis zu Sirupkonsistenz scheidet sich zunächst das Kreatin (4,8 g) aus; dann wurden 18,5 g Kreatinin erhalten. Die restliche alkalische Mutterlauge wurde mit alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt. Nachdem sich etwa 80 g anorganische Pikrate, die bei über 290° nicht schmelzen, ausschieden und das eingeeengte Filtrat mit alkoholischer Pikrinsäurelösung bis zur neutralen Reaktion versetzt wurde, liess man die Lösung im Eisschrank stehen. Dabei schieden sich 6,9 g des Pikrates aus, welches nach wiederholtem Umkrystallisieren bei 243° schmolz und folgende Analysendaten ergab:

4,135 mg Subst.: 4,750 mg CO₂, 0,770 mg H₂O.
 3,485 mg Subst.: 0,598 ccm N₂ (17°, 758 mm).
 1,0000 g Subst.: 0,7594 g Pikrinsäure.
 0,2464 g Subst.: 0,0345 g K₂SO₄.

Ber. für C ₄ H ₇ N ₃ O·C ₆ H ₂ N ₃ O ₇ ·C ₆ H ₂ N ₃ O ₇ K:		Gefunden
C	31,52%	31,33%
H	1,97 "	2,08 "
N	20,68 "	20,15 "
K	6,40 "	6,26 "
Pikrinsäure	75,19 "	75,94 "

Aus den Analysendaten geht hervor, dass die Substanz aus Kreatinin-Kalumpikrat bestand.

Man lässt das Kreatinin-Kalumpikrat vollständig auskrystallisieren. Das Filtrat wurde unter Zusatz von Schwefelsäure mit Äther extrahiert. Die von Pikrinsäure befreite saure Lösung wurde mit Baryt und dann mit Kohlensäure behandelt; die regenerierte Basenlösung wurde dann mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung versetzt. Dabei schieden sich reichlich Krystalle aus. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren bekommt man ein Pikrolonat, welches bei 163–164° schmilzt. Diese Verbindung ist eine der

Hauptsubstanzen der basischen Extraktivstoffe der Muskeln von Dermochelys Schlegeli. Ausbeute 20,2 g als Pikrolonat.

3,955 mg Subst.: 6,350 mg CO₂, 1,640 mg H₂O.

1,965 mg Subst.: 0,377 cem N₂ (30°, 759 mm).

0,0620 g Subst. verloren über P₂O₅ in Vacuum u. 120° 0,0042 g an Gewicht.

Ber. für C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃ ·C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₅ + 2H ₂ O	Gefunden
C 43,32%	43,79%
H 4,97 "	4,64 "
N 21,29 "	21,59 "
H ₂ O 6,84 "	6,77 "

Das Pikrolonat wurde mit Schwefelsäure zerlegt und mit Äther extrahiert um die Pikrolonsäure zu beseitigen.

Die wässrige Lösung zeigt eine Ninhydrinreaktion. Pauly'sche Diazoreaktion ist auch positiv.

Für die optische Bestimmung diente eine wässrige Lösung.

$$[\alpha]_D^{20} = +31,0^\circ$$

Wird die wässrige Lösung stark eingengt und im Eisschrank stehen gelassen, so bekommt man daraus eine freie Base in Krystallform, die bei 252° schmilzt.

4,130 mg Subst.: 7,170 mg CO₂, 2,260 mg H₂O.

2,335 mg Subst.: 0,524 cem N₂ (32°, 758 mm).

Ber. für C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃	Gefunden
C 47,78%	47,35%
H 6,19 "	6,12 "
N 24,77 "	25,05 "

Die Analysendaten des Pikrolonates und der freien Verbindung stimmen also mit denen des Carnosins überein. Ausserdem zeigt ja auch das Pikrat dieser Verbindung die für das Carnosin-pikrat berechneten Analysenwerte.

3,900 mg Subst.: 5,700 mg CO₂, 1,350 mg H₂O.

Ber. für C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃ ·C ₆ H ₃ N ₃ O ₇	Gefunden
C 39,55%	39,86%
H 3,76 "	3,87 "

Um einen Vergleich der isolierten Substanz mit dem Carnosin zu erleichtern, sind die Resultate tabellarisch zusammengestellt.

TABELLE II.

Salze oder freie Substanz	Schmelzpunkt		Eigenschaften d. freien Subst.	
	isolierte Substanz	Carnosin	isolierte Substanz	Carnosin
Pikrolonat	164°	163°		
Pikrat	224°	224°		
Nitrat	219°	219°		
Cu-Salz	220°	220°		
Freie Subst.	252°	248°		
Pauly'sche R.			+	+
Ninhydrin-R.			+	+
$[\alpha]_D$			+31,0°	+25,0°

Zur weiteren Identifizierung wurde ein Spaltungsversuch der Verbindung gemacht, indem 2 g der freien Substanz 5 Stunden mit 40 ccm 24%iger HBr-Lösung am Rückflusskühler gekocht wurden; der überschüssige Bromwasserstoff wurde durch Abdampfen unter vermindertem Druck grösstenteils entfernt und zuletzt mit Silberoxyd der Rest beseitigt. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff entsilbert und in Vacuum zu Sirup eingengt und im Exsiccator getrocknet. Dabei schieden sich 0,76 g weisse Krystalle aus, die bei 195° schmolzen.

4,105 mg Subst.: 5,945 mg CO₂, 2,830 mg H₂O.

3,265 mg Subst.: 0,451 ccm N₂ (24°, 765 mm).

Ber für C₃H₇NO₂

Gefunden

C 40,44%

39,50%

H 7,92 "

7,71 "

N 15,73 "

15,98 "

Auf Grund der Analyse und des Schmelzpunktes wird die Substanz als mit β -Alanin identisch angenommen.

Um das Histidin als ein Spaltungsprodukt zu erhalten wurde ein Spaltungsversuch mit Barytwasser ausgeführt. 1,6 g der freien Substanz wurden mit 12,5 g des gepulverten Bariumhydrates und

20 ccm Wasser vermischt, in eingeschmolzenem Rohr 6 Stunden im Ölbad (Temp. 140°) gekocht. Das Hydrolysat wurde mit Schwefelsäure behandelt und das Filtrat wieder mit Barytwasser von Schwefelsäure befreit. Das von Schwefelsäure und Baryt befreite Filtrat wurde zu Sirup eingedampft und dann mit alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt. Es schieden sich daraus Krystalle von Histidinpikrat (0,6 g), die bei 188° schmolzen und folgende Analysenwerte zeigten:

4,140 mg Subst.: 5,555 mg CO₂, 1,250 mg H₂O.

2,290 mg Subst.: 0,402 ccm N₂ (27°, 762 mm).

Ber. für	C ₆ H ₆ N ₃ O ₂ ·C ₆ H ₃ N ₃ O ₇ + H ₂ O	Gefunden
C	35,82%	36,59%
H	3,50 "	3,38 "
N	20,90 "	20,03 "

Das Filtrat vom Histidinpikrat wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Die von Pikrinsäure befreite wässrige Lösung wurde mit Baryt und Kohlensäure behandelt und die regenerierte Lösung wurde eingengt und mit *n*-Natronlauge und α -Naphthyl-isocyanat geschüttelt. Hat man das Filtrat mit Salzsäure versetzt, so fiel α -Naphthylisocyanat des β -Alanins aus, welches folgende Analysendaten ergab:

3,520 mg Subst.: 8,455 mg CO₂, 1,660 mg H₂O.

Ber. für	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	Gefunden
C	65,09%	65,51%
H	5,46 "	5,28 "

Auf Grund der bis jetzt ausgeführten Untersuchungen ergab der Vergleich der von Verf. aus Dermochelys Schlegeli aufgefundenen Verbindung mit Carnosin die vollste Identität beider Körper.

Beim Umkrystallisieren des Carnosinpikrolonates wurde ein in Wasser schwerer löslicher Anteil (0,9 g) erhalten. Dieses Pikrolonat schmilzt bei 213°, zeigt folgende Analysenzahlen:

3,560 mg Subst.: 5,900 mg CO₂, 1,270 mg H₂O.

2,750 mg Subst.: 0,500 ccm N₂ (17°, 759 mm).

Ber. für	C ₆ H ₈ N ₂ O ₂ ·C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₅	C 45,91%	H 4,08%	N 21,48%
Gefunden:		45,20 "	3,98 "	21,37 "

Zur Ermittlung der Konstitution dieser Verbindung sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Das Filtrat (C) des Carnosin-pikrolonats und eines bei 213° schmelzenden Pikrolonates wurde nach dem Zusatz von Schwefelsäure mit Äther extrahiert und die von Pikrolonsäure befreite wässrige Lösung wurde mit Baryt behandelt und in 5%iger schwefelsaurer Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt. Das Filtrat (D) der Phosphorwolframsäure-Fällung wurde nach der Baryt-Zersetzung stark eingengt und in schwefelsaurer Lösung mit Quecksilbersulfat gefällt. Man hat das Filtrat (E) mit Schwefelwasserstoff behandelt, die Schwefelsäure mit Baryt und den Barytüberschuss mit Kohlensäure beseitigt. Der stark eingengte Rückstand wurde mit absolutem Alkohol extrahiert und der Alkoholextrakt dann mit einer warm gesättigten Sublimatlösung gefällt. Diese Fällung (F) wurde mit warmem Wasser digeriert, mit Schwefelwasserstoff entquecksilbert, in Vacuum bis zu Sirupkonsistenz eingengt und mit Alkohol extrahiert. Der Alkoholextrakt wurde dann mit Platinchloridlösung gefällt, worauf ein in heissem Wasser leicht und in Alkohol schwer lösliches Platinchloriddoppelsalz erschien. Die aus heissem Wasser umkrystallisierte Substanz schmolz bei 226° , sie zeigt folgende Analysenzahlen:

3,260 mg Subst.: 3,445 mg CO_2 , 1,480 mg H_2O .

2,890 mg Subst.: 0,118 ccm N_2 (27° , 761 mm).

0,0454 g Subst.: 0,0115 g Pt.

Ber. für $(\text{C}_9\text{H}_{20}\text{NO}_2\text{Cl})_2\text{PtCl}_4$:		Gefunden:
C	28,57%	28,82%
H	5,29 "	5,08 "
N	3,70 "	4,65 "
Pt	25,75 "	25,33 "

0,7 g Platinsalz wurden mit Schwefelwasserstoff zersetzt, der Platinsulfidniederschlag abfiltriert und sorgfältig gewaschen. Das gesammelte Filtrat wurde in vacuo völlig getrocknet, der Rückstand in Alkohol gelöst und mit alkoholischer Goldchloridlösung gefällt. Zur Reinigung wurde das Salz aus heissem Wasser umkrystallisiert.

Diese Verbindung krystallisiert in gelben Nadeln, ist in heissem Wasser leicht und in kaltem wenig löslich, schmilzt bei 102° .

3,485 mg Subst.: 2,705 mg CO₂, 1,155 mg H₂O.

9,095 mg Subst.: 0,225 ccm N₂ (17°, 776 mm).

3,485 mg Subst.: 1,345 mg Au.

Ber. für C₉H₂₀NO₂·AuCl₄:

Gefunden:

C	21,05%	21,17%
H	3,89 "	3,71 "
N	2,72 "	2,95 "
Au	38,40 "	38,59 "

Ein mit dieser Verbindung in vielen wesentlichen Eigenschaften übereinstimmendes Produkt wurde von Kutscher (1905) aus Liebig'schem Fleischextrakte erhalten. Er bezeichnete dasselbe als „Oblitin“, welches sich von Verfasser's Substanz nur durch ein Mehr von $\frac{1}{2}$ Sauerstoffatom unterscheidet.

Nach den Elementaranalysen und dem Schmelzpunkt der Edelmetallsalze scheint Verf. Verbindung ein Äthylester des γ -Butyrobetains zu sein. Das Aussehen, Verhalten gegen Lösungsmittel von Verf. Base und des synthetischen Produktes zeigten ebenfalls eine befriedende Übereinstimmung. Tabelle III zeigte einen Vergleich der beiden Verbindungen und des Oblitins.

TABELLE III.

Pt. u. Au-Salze	Oblitin	γ -Butyrobetain- äthylester	Meine Subst.
1. Platinsalz:	(berechnet)	(berechnet)	(gefunden)
Analysendaten $\left\{ \begin{array}{l} \text{C} \\ \text{H} \\ \text{N} \\ \text{Pt} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 27,96\% \\ 5,21\% \\ 3,62\% \\ 25,26\% \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 28,57\% \\ 5,29\% \\ 3,70\% \\ 25,75\% \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 28,82\% \\ 5,08\% \\ 4,65\% \\ 25,33\% \end{array} \right.$
Schmp.	216–230° (Kutscher) 216–217° (Krimberg)	225°	226°
2. Goldsalz:			
Analysendaten $\left\{ \begin{array}{l} \text{C} \\ \text{H} \\ \text{N} \\ \text{Au} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 20,71\% \\ 3,36\% \\ 2,68\% \\ 37,82\% \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 21,05\% \\ 3,89\% \\ 2,72\% \\ 38,40\% \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 21,17\% \\ 3,71\% \\ 2,95\% \\ 38,59\% \end{array} \right.$
Schmp.	107°		102°

Die Untersuchungsergebnisse des Muskels von Dermochelys Schlegeli sind kurz in Tabelle IV zusammengestellt.

TABELLE IV.

Aus 18,3 kg frischen Muskeln von Dermochelys Schlegeli			
Extraktivstoffe	Freie Substanz oder Salze	Schmelzpunkt	Ausbeute
Kreatin	frei		40,3 g
Kreatinin	frei		18,5 g
Kreatinin-	K-pikrat	243°	6,9 g
Carnosin-	Pikrolonat	163°	20,2 g
$C_5H_8N_2O_2$	Pikrolonat	213°	0,9 g
$(C_8H_{20}NO_2Cl)_2PtCl_4$ (γ -Butyrobetainäthylester- chloroplatinat?)		226°	ca 2 g

*B. Isolierung der N-haltigen Extraktstoffe aus der
Muskulatur von Chelonia japonica.*

Nachdem durch voranstehende Untersuchung festgestellt wurde, dass die Extraktivstoffe der Muskulatur von Dermochelys Schlegeli in ihrer Zusammensetzung eine Abweichung von denen des Schlangemuskelns zeigten, lag es nahe, nun auch die Muskeln der anderen Arten von Meerschildkröten einem näheren Studium zu unterziehen.

Für diesen Zweck wurden 13,7 kg frische Muskeln von Chelonia japonica (Thunb.) verwendet. Die Versuchsanordnung und Aus-

TABELLE V.

Aus 13,7 kg frischen Muskeln von Chelonia japonica			
Extraktivstoffe	Freie Substanz oder Salze	Schmelzpunkt	Ausbeute
Kreatin	frei		42,2 g
Kreatinin	frei		10,8 g
Kreatinin-	K-pikrat	243°	6,5 g
Carnosin-	Pikrat	224°	3,1 g
Carnosin-	Pikrolonat	163°	18,2 g
$C_5H_8N_2O_2$	Pikrolonat	213°	1,9 g
$(C_8H_{20}NO_2Cl)_2PtCl_4$ (γ -Butyrobetainäthylester- chloroplatinat?)		226°	ca 1,7 g

führung der Basenisolierung geschah ähnlich wie in den voranstehenden Experimenten.

Die Ergebnisse der Untersuchung bei der Muskulatur von *Chelonia japonica* sind tabellarisch niedergelegt (Tabelle V).

ZUSAMMENFASSUNG.

Die vorliegende Untersuchung hat also als Bestandteile der Muskulatur von *Dermochelys Schlegeli* und *Chelonia japonica* Kreatin, Kreatinin und Carnosin ergeben. Ferner wurde ein Platinat isoliert, dessen Identität mit γ -Butyrobetain-äthylester aus Analysenzahlen und Schmelzpunkt der Edelmetalldoppelsalze höchst wahrscheinlich ist, und ein Pikrolonat von der summarischen Formel $C_5H_8N_2O_2 \cdot C_{10}H_8N_4O_5$.

Überraschend ist, dass das Carnosin in den Muskeln von Meerschildkröten in einem grossen Quantum enthalten ist, welches bei anderen Sauropsiden in geringer Menge gefunden wurde und anstatt desselben das Anserin aus den Vögelmuskeln und das Ophidin aus Schlangenmuskulatur isoliert wurde.

Das Auftreten von γ -Butyrobetain-äthylester in diesem Wirbeltiermuskel ist interessant, weil sich die Anzeichen für ein Vorkommen der Äthylester der Base in der Tierwelt mehrten. Zuerst wurde im Jahre 1910 aus Rinderfleisch das Oblitin isoliert, welches einem Äthylester des in verschiedenen Säugetiermuskeln enthaltenden Carnitins entspricht. In ähnlicher Beziehung steht meine Verbindung, weil ihre Kernsubstanz, nämlich γ -Butyrobetain, als einen Bestandteil des Pythonmuskels erwiesen wurde.

In dieser Mitteilung konnte über die Purinbasenfraktion nichts ausgesagt werden. Die Versuche, sie erneut darzustellen und einzelne Bestandteile darin zu isolieren, sind im Gang.

LITERATUR.

- Ackermann, D., Timpe, O. u. Poller, K. (1929): Zs. f. physiol. Chem. 183, 1.
Imamura, H. (1939): Jl. of Biochem. 30, 479.
Keil, A. W., Linneweh, W. u. Poller, K. (1927): Zs. f. Biol. 86, 187.
Kendo, K. (1942): Jl. of Biochem. 36, 265.

Kutscher, Fr. (1905): Zs. f. Unters. d. Nahr. u. Genussm. **10**, 528; **11**, 582.

Kutscher, Fr. u. Ackermann, D. (1927): Zs. f. Biol. **84**, 181.

Linneweh, W., Keil, A. W. u. Hoppe-Seyler, F. A. (1929): Zs. f. physiol. Chem. **181**, 11.

Krimberg, (1908): Zs. f. physiol. Chem. **55**, 472.

CHEMIE DER MEERSCHILDKRÖTEN.

II. Über die Fermente der Meerschildkrötenorgane.

VON

HIROSHI TANAKA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität
zu Taihoku. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 8. Oktober 1942)

Die Lehre von der vergleichenden Biochemie kann eine grosse Rolle in der Anbahnung klarer morphologischer Verhältnisse spielen. Wenn es in künftiger Zeit der vergleichend-biochemischen Forschung gelungen sein wird, das Dunkel zu lichten, das einstweilen noch über die geheimnisvollen Vorgänge der tierischen Organisation gebreitet ist, dürfte es voraussichtlich möglich sein, eine Fülle von heterogenen Wahrnehmungen in organischen Zusammenhang zu bringen und zu verstehen, die uns heute noch unzusammenhängend und unverständlich erscheinen müssen.

Wir sind berechtigt anzunehmen, dass alle tiefgehenden chemischen Umsetzungen, welche sich in lebenden Zellen abspielen, sich durch die Wirkungen der darin vorhandenen Fermente erklären lassen.

Trotz der intensiven Bearbeitung, die das Gebiet der Fermentwirkung in den letzten Jahren erfahren hat, konnte in keinem Fall die Lokalisation einzelnen Fermente vergleichend-biochemisch klargestellt werden. Es wäre also von Interesse, eine Beziehung festzustellen zwischen dem Fermentgehalt der verschiedenen Organe und der Tierarten.

Nachdem H. Imamura (1940) im hiesigen Institut die Fermente der Schlangenorgane untersucht hatte, war es geboten festzustellen, wie es sich bei einer anderen Art der Reptilien, nämlich bei den Meerschildkröten verhält.

Von den verschiedenen Fermenten wurden hier Amylase, Lipase, Pepsin, Trypsin, Dipeptidase, Arginase, Phosphatase und Urease mit den Organen von *Chelonia japonica* untersucht. Beim

Versuche mit Organen von *Dermochelys Schlegeli* wurden Trypsin, Dipeptidase und Urease wegen des Mangels von Material nicht erforscht.

Einzelne Organe wurden nach dem Zerreiben mit 5 fachen Mengen 50% Glycerin bei 0° 24 Stunden lang extrahiert. Bei dem Magen und Darm wurde die Schleimhaut zum Versuche verwendet. Man benutzt die abfiltrierte Lösung des oben erwähnten Glycerin-extraktes als Fermentlösung.

EXPERIMENTELLE BELEGE.

1. *Amylasewirkung der Organe.*

Die Digestionsflüssigkeit wird folgendermassen zusammen-
gestellt:

- 5 ccm Organextrakt.
- 25 ccm Substratlösung (2 proz. Stärkelösung).
- 10 ccm Phosphatpuffer (pH = 6,8).
- 1 ccm *n*-NaCl-lösung.
- 9 ccm Wasser.
- 0,5 ccm Toluol.

Nach 24 stündiger Digestion wurde die abgespaltene Glukose nach dem Bertrand'schen Verfahren ermittelt.

Tabelle I zeigt die Resultate.

TABELLE I a.
Versuche an *Chelonia japonica*.

Arten der Organe	Menge von KMnO_4 (ccm) *		Abgespaltene Stärke (%)
	Berechnet	Gefunden	
Magen	60,0	11,5	19,1
Darm	"	7,0	11,6
Leber	"	10,1	16,6
Pankreas	"	21,5	35,8
Milz	"	8,9	13,3
Niere	"	2,7	4,5
Lunge	"	3,5	5,8
Herz	"	6,5	10,8
Muskel	"	2,0	3,3

* 1 ccm $\text{KMnO}_4 \approx 10,09$ mg Glukose.

TABELLE I b.
Versuche an Dermochelys Schlegeli.

Arten der Organe	Menge von KMnO_4 (cem)		Abgespaltene Stärke(%)
	Berechnet	Gefunden	
Magen	60,0	12,0	20,0
Darm	„	15,0	25,0
Leber	„	18,5	30,8
Pankreas	„	45,0	75,0
Milz	„	23,0	38,3
Niere	„	25,0	41,6

Die Tabellen lehren, dass ein und dasselbe Organ verschiedener Tierarten nicht sehr ungleiche Werte für den Gehalt an Amylase lieferte; für die diversen Gewebe desselben Tieres bestehen jedoch erhebliche Schwankungen. Amylasewirkung trat beim Pankreas am stärksten hervor.

2. Untersuchung der Lipase.

10 cem des Organextraktes wurden mit 25 cem Tributyrinlösung (10 g Tributyrin in 500 cem Wasser) als Substrat versetzt. Dem Gemisch hat man als Puffer und Aktivator 2 cem *n*-Ammoniakchlorammonlösung (pH=8,9), 0,5 cem 2% CaCl_2 -Lösung und 0,5 cem

TABELLE II.

Arten der Organe	Aciditätszunahme (cem <i>n</i> /10-KOH)	
	bei Chelonia japon.	bei Dermochel. Schl.
Magen	5,7	7,7
Darm	6,4	8,6
Leber	7,8	9,5
Pankreas	9,6	14,4
Milz	5,2	1,6
Niere	7,5	10,0
Lunge	2,3	—
Herz	1,6	—
Muskel	0,2	—

3% Eialbuminlösung zugesetzt. Nach der Digestion wurde die Aciditätszunahme mit $n/10$ -KOH titrimetrisch bestimmt.

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind tabellarisch niedergelegt (Tabelle II).

Bei Betrachtung von Tabelle II sieht man, dass hinsichtlich der Tributurinasewirkung ein sehr ähnliches Verhalten zwischen den Geweben von *Chelonia japonica* und *Dermochelys Schlegeli* besteht. Nach der Stärke des Verseifungsvermögens ordnen sich die Organe folgendermassen: Pankreas, Niere und Leber, Darm, Magen, Milz.

3. Pepsinwirkung der Organe.

Das Verdauungsgemisch wird wie folgt dargestellt:

- 10 cem Kaseinlösung (10 g Casein, 8 cem n -NaOH-lösung,
250 cem Wasser, auf dem Wasserbad unter Erwärmung gelöst.)
- 5 cem Organextrakt.
- 15 cem $n/15$ -HCl.
- 0,5 cem Toluol.

Das Gemisch wird 24 Stunden lang bei 37° digeriert und dann nach dem Verfahren von Volhard und Löhlein (1906) mit $n/10$ -NaOH titriert. Es zeigt sich folgendes:

TABELLE III a.
Versuche an *Chelonia japonica*.

Arten der Organe	$n/10$ -NaOH-lösung (cem)		Zunahme der $n/10$ -NaOH-lösung (cem)
	Vor der Digestion	Nach der Digestion	
Magen	1,20	2,80	1,60
Darm	1,05	1,70	0,65
Leber	1,00	1,40	0,40
Pankreas	1,00	1,60	0,60
Milz	1,20	2,30	1,10
Niere	1,00	1,40	0,40
Lunge	1,10	1,20	0,10
Herz	1,10	1,10	0,00
Muskel	1,20	1,20	0,00

TABELLE III b.
Versuche an Dermochelys Schlegeli.

Arten der Organe	n/10-NaOH-lösung (ccm)		Zunahme der n/10-NaOH-lösung (cm)
	Vor der Digestion	Nach der Digestion	
Magen	6,40	10,80	4,40
Darm	5,20	10,40	5,20
Leber	4,00	5,44	1,44
Pankreas	4,00	4,96	0,96
Milz	4,00	4,40	0,40
Niere	3,60	5,00	1,40

Den Tabellen IIIa und IIIb kann man entnehmen, dass die Pepsintätigkeit ungleicher Meerschildkröten einige Abweichungen aufweist. Bemerkenswert erscheinen die Befunde für die Milz von *Chelonia japonica* und den Darm von *Dermochelys Schlegeli*, bei denen wie beim Magen die Pepsinwirkung eine ziemlich bedeutende ist.

4. Untersuchung der Trypsinwirkung.

Die Trypsinwirkung wurde nach Waldschmidt-Leitz (1923) ermittelt.

1 ccm des Organextraktes wird mit 0,3 ccm nach seinem Verfahren dargestellter Enterokinaselösung und 1,7 ccm Wasser vermischt. Nach halbstündigen Stehenlassen bei 30° wird die Lösung mit 5 ccm Peptonlösung (6 proz.) und 2 ccm *n*-Ammoniakchlorammon-Puffer (pH=8,9) gemischt und 20 Minuten lang bei 30° digeriert. Die Aciditätszunahme wird mit *n*/5-KOH titrimetrisch bestimmt.

Die Resultate sind aus Tabelle IV ersichtlich.

Man hätte vielleicht eine starke Trypsinwirkung im Pankreas der *Chelonia japonica* erwarten sollen. Während das Pankreas dieses Tieres zugesetzte Stärke und Tributyrin sehr stark angriff, ist die Hydrolyse der Peptone bei meiner Versuchsanordnung durch dieses Organ schwächer als Darm, Leber und Milz. Ein ähnliches Verhalten hat Imamura (1940) im hiesigen Institut bei seiner

TABELLE IV.
Versuche an *Chelonia japonica*.

Arten der Organe	Menge der $n/5$ -KOH in cem		Der Aciditäts- zuwachs (cem $n/5$ -KOH)
	Versuche	Kontrolle	
Magen	12,60	12,60	0,00
Darm	12,70	12,60	0,10
Leber	12,80	12,60	0,20
Pankreas	12,60	12,60	0,00
Milz	13,00	12,65	0,35
Niere	12,60	12,60	0,00
Lunge	12,62	12,60	0,02
Herz	12,65	12,60	0,05
Muskel	12,00	12,00	0,00

Untersuchung der Fermente der Schlangenorgane bemerkt. Es zeigte sich dabei, dass eine Trypsinwirkung des Schlangenpankreas sehr schwach ist, sie steht dem Darm und der Leber dieses Tieres nach.

Nicht untersucht wurde die Frage, ob das Pankreas der *Chelonia japonica* überhaupt kein Trypsin besitzt oder seine Trypsinwirkung durch irgend einen anderen Faktor beeinflusst wird. Hier genüge der Hinweis, dass die proteolytischen Wirkungen des Reptilienpankreas nach verschiedenen Richtungen noch Gegenstand eingehender Prüfung sein sollen.

5. Untersuchung der Dipeptidasewirkung.

5 cem Dipeptidlösung (0,1 g Glycylglycin in $1/5$ -M-Phosphatpuffer, $\text{pH}=7,5$), 2 cem Organextrakt, 1,8 cem $n/5$ -NaOH und 1,2 cem Wasser werden gemischt und bei 40° 1 Stunde lang digeriert. Dann werden 130 cem Methanol zugesetzt und mit $n/5$ -alkoholischer KOH-Lösung unter Zusatz von Thymolphthalein als Indikator titriert.

Die Befunde sind in Tabelle V verzeichnet.

Es offenbart sich somit, dass die Dipeptidasetätigkeit ungleicher Organe desselben Tieres beträchtliche Unterschiede aufweist.

TABELLE V.
Versuche an *Chelonia japonica*.

Arten der Organe	Menge der $n/5$ -KOH in cem		Der Aciditäts- zuwachs (cem $n/5$ -KOH)
	Versuche	Kontrolle	
Magen	2,90	2,80	0,10
Darm	3,60	2,85	0,75
Leber	3,80	2,90	0,90
Pankreas	2,80	2,80	0,00
Milz	3,50	3,30	0,20
Niere	4,90	2,90	2,00
Lunge	2,70	2,70	0,00
Herz	3,05	2,80	0,35
Muskel	2,90	2,80	0,10

Bemerkenswert erscheinen die Befunde für Niere, bei der der Aciditätszuwachs sehr gross ist.

6. Die Stärke der Arginasewirkung einzelner Organe.

In unserem Laboratorium (1925–1940) wurde schon festgestellt, dass sich die Arginase, die bei Säugetieren hauptsächlich in der Leber vorkommt, in der Niere bei Vögeln, in der Leber und zum Teil auch in der Niere bei den Amphibien und in der Leber beim Fisch findet. Dass sich die Argininspaltung auch in Schildkröten- und Schlangenorganen vollzieht und die Niere sehr kräftig hydrolytisch spaltend wirkt, ist konstatiert. In Meerschildkrötenorganen habe ich dasselbe Verhalten gefunden, welches sehr beachtenswert erscheint, weil man sich vorstellen kann, dass sich die fermentativen Vorgänge im Reptilienorganismus zu denen des Vogels sehr ähnlich, wie ihre morphologischen Verwandtschaftsverhältnisse verhalten.

Die Stärke der Arginasewirkung wurde nach der Edlbacher'schen (1925) Methode ermittelt.

5 cem Arginin (1–2 proz.) wurden mit 5 cem Organextrakt und 10 cem Glycin-NaOH-Puffer ($\text{pH} = 9,7$) gemischt. Nach 48 stündiger Digestion wurde das Digerat mit 3 cem $n/10$ -NaOH versetzt und

auf siedendem Wasserbade 10 Minuten lang erhitzt. Nach dem Erkalten hat man dieser Lösung 10 cem *M/15*-Phosphatpuffer und Sojabohnen-Urease zugesetzt. Das aus Harnstoff gebildete Ammoniak wurde nach 24 Stunden bestimmt.

Die Resultate geben Tabellen VIa und VIb wieder.

TABELLE VI a.
Versuche an *Chelonia japonica*.

Arten der Organe	Zu- gesetztes Arginin (g)	Harnstoff		
		Berechnet (g)	Gefunden (g)	Gefunden (%)
Magen	0,05	0,0172	0,0000	0
Darm	"	"	0,0000	0
Leber	"	"	0,0036	20,93
Pankreas	"	"	0,0000	0
Milz	"	"	0,0003	1,74
Niere	"	"	0,0030	17,44
Lunge	"	"	0,0003	1,74
Herz	"	"	0,0003	1,74
Muskel	"	"	0,0012	6,98

TABELLE VI b.
Versuche an *Dermochelys Schlegeli*.

Arten der Organe	Zu- gesetztes Arginin (g)	Harnstoff		
		Berechnet (g)	Gefunden (g)	Gefunden (%)
Magen	0,10	0,0344	0,0015	4,36
Darm	"	"	0	0
Leber	"	"	0,0234	68,02
Pankreas	"	"	0,0027	7,85
Milz	"	"	0	0
Niere	"	"	0,0255	74,13

Aus den Tabellen geht hervor, dass der Niere und der Leber der Meerschildkröten eine starke arginin-spaltende Kraft zukommt.

7. *Ureasewirkung der Organe.*

5 ccm des Organextraktes, der aus einzelnen Organen der *Chelonia japonica* auf oben erwähnte Weise hergestellt wurde, wurden mit 10 ccm 2% Harnstofflösung, 10 ccm 1/15-mol. Phosphatpuffer (pH=7,0) und 0,5 ccm Toluol versetzt. Nach 24 Stunden wurde das aus Harnstoff abgespaltene Ammoniak bestimmt. 0,2 g Harnstoff geben nach vollständiger Spaltung 0,1133 g Ammoniak.

Die Ergebnisse lassen sich aus Tabelle VII ersehen.

TABELLE VII.

Arten der Organe	Menge des zugesetzt. Harnstoff (g)	Ammoniak (g)		Abgespalten. Harnstoff (%)
		Berechnet	Gefunden	
Magen	0,2	0,1133	0	0
Darm	"	"	0,0054	4,77
Leber	"	"	0,0006	0,53
Pankreas	"	"	0	0
Milz	"	"	0	0
Niere	"	"	0	0
Lunge	"	"	0	0
Herz	"	"	0	0
Muskel	"	"	0	0

Gemäss Tabelle VII ist die harnstoffspaltende Kraft in den meisten Organen nicht nachweisbar. Nur im Darm kommt die Urease spurweise vor.

8. *Untersuchung der Phosphatasewirkung der einzelnen Organe.*

5 ccm des Organextraktes wurden mit 10 ccm Na-glycerophosphatlösung (1%) oder 25 ccm 1% Ca-fruktose-monophosphatlösung und 10 ccm H₂O versetzt und unter Zusatz von Toluol bei 37° digeriert. Nach 72 stündiger Digestion wurde das Digerat mit 10-ccm 1% Trichloressigsäure enteiweissst. Das abgespaltene anorganische Phosphat wurde nach Neumann ermittelt. Da Natriumglycerophosphat C₃H₇O₂·OPO₃Na₂ 32,87% P₂O₅ enthält, so

entsprechen 10 ccm 1% Na-glycerophosphats ($=0,1$ g) 32,87 mg P_2O_5 . Aus 25 ccm 1% Ca-fructo-monophosphats $C_6H_{11}O_5 \cdot OPO_3Ca$ ($=0,25$ g) liefert 59,56 mg P_2O_5 .

Die Resultate sind in Tabelle VIIIa und VIIIb niedergelegt.

TABELLE VIII a.
Versuche an *Chelonia japonica*.

Arten der Organe	Abgespaltene Menge von P_2O_5 aus			
	Na-glycero-phosphat (0,1 g)		Ca-fructose-monophosphat (0,25 g)	
	mg	%	mg	%
Magen	8,49	35,82	7,60	12,76
Darm	16,27	58,62	6,18	10,92
Leber	1,83	5,56	11,41	19,15
Pankreas	10,08	30,66	3,75	6,63
Milz	7,10	21,60	10,14	17,02
Niere	22,88	69,60	7,70	12,92
Lunge	18,63	56,67	0	0
Herz	7,04	21,41	2,34	4,13
Muskel	1,26	3,83	2,33	4,11

TABELLE VIII b.
Versuche an *Dermochelys Schlegeli*.

Arten der Organe	Abgespaltene Menge von P_2O_5 aus Na-glycero-phosphat (0,1 g)	
	mg	%
Magen	0	0
Darm	6,27	19,07
Leber	15,34	46,66
Pankreas	14,20	43,20
Milz	22,69	69,02
Niere	17,14	52,14

Bei Betrachtung der soeben angeführten beiden Tabellen sieht man, dass die Phosphatase-tätigkeit ungleicher Organe beträchtliche Unterschiede aufweist und dass ein und dasselbe Organ beider

Arten der Meerschildkröte nicht gleiche Werte für den Gehalt an Glycerinphosphatase liefert. Die Reihenfolge der Wirksamkeit der Glycerophosphatase scheint für die einzelnen Organe ungleich zu sein wie bezüglich der Fructose-monophosphatase. Es erscheint beachtenswert, dass Niere immer sehr kräftig verseifend wirkt.

Die bei den verschiedenen Versuchen erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle IX kurz schematisch verzeichnet.

TABELLE IX.

Chel.—Chelonia japonica.

Derm.—Dermochelys Schl.

Arten der Fermente	Arten der Organe								
	Magen	Darm	Leber	Pan- creas	Milz	Niere	Lunge	Herz	Muskel
Amylase:									
Chel.	+	+	+	++	+	±	±	+	±
Derm.	+	+	+	##	++	++			
Lipase:									
Chel.	+	+	++	++	+	++	+	+	±
Derm.	+	+	++	++	+	++			
Pepsin:									
Chel.	++	+	+	+	++	+	±	—	—
Derm.	##	##	+	+	+	+			
Trypsin:									
Chel.	—	±	+	—	+	—	—	—	—
Dipeptidase:									
Chel.	±	+	+	—	±	++	—	+	±
Arginase:									
Chel.	—	—	++	—	±	++			
Derm.	±	—	++	+	—	++	±	±	±
Urease:									
Chel.	—	+	±	—	—	—	—	—	—
Glycero- phosphatase:									
Chel.	+	++	±	+	+	++	++	+	±
Derm.	—	+	++	+	++	++			
Fructo-mono- phosphatase:									
Chel.	+	+	++	+	++	++	—	+	+

LITERATUR.

- Edlbacher, S. und Röthler (1925): Zs. f. physiol. Chem. **148**, 264.
Imamura, H. (1940): Diese Zs. **31**, 13.
Kumon, T. (1933): Diese Zs. **18**, 145.
Sendju, Y. (1925): Diese Zs. **5**, 229.
Tomita, M. (1922): Biochem. Zs. **131**, 161-170.
Volhard, u. Löhlein (1906): Hofmeisters Beiträge **7**, 120.
Waldschmidt-Leitz (1923): Zs. f. physiol. Chem. **132**, 195.

CHEMIE DER MEERSCHILDKRÖTEN.

III. Chemische Untersuchungen des Harns von *Chelonia japonica* Thumb.

VON

HIROSHI TANAKA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität
zu Taihoku. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 8. Oktober 1942)

Betrachtet man vergleichend die Zusammensetzung des Harns der Wirbeltiere, so zerfallen sie bekanntlich hinsichtlich ihres Stoffwechsels in zwei Kategorien: Bei Fischen, Amphibien und Säugtieren ist der Harnstoff, bei Vögeln die Harnsäure als das wesentlichste stickstoffhaltige Stoffwechselendprodukt anzusehen.

Dem früher Gesagten zufolge ist man berechtigt, anzunehmen, dass innerhalb der ganzen Klasse der Vögel und Schlangen nicht Harnstoff, sondern Harnsäure der Hauptträger des Stickstoffes in ihrem Harn ist. Doch würde man fehlgehen, wenn man diese Tatsache in Bezug auf die ganzen Reptilien verallgemeinern wollte, da unsere Kenntnisse hinsichtlich der Exkretionsvorgänge bei anderen Reptilienklassen noch sehr dürftig und ohne jede feste Grundlage sind.

Wir nahmen daher die Gelegenheit des chemischen Studiums der *Chelonia japonica* (Thumb.) wahr, um uns eine Harnprobe dieses Tieres zu beschaffen, und eine genauere Untersuchung auszuführen.

I. Die physikalischen Eigenschaften des Harns von *Chelonia japonica* (Thumb.).

Wegen der mit der Behandlung des lebenden Tieres verbundenen Schwierigkeit können die physikalischen Eigenschaften des Harns der lebenden Tiere nicht untersucht werden. Der Harn wurde also immer unmittelbar nach dem Tode aus der Harnblase

gesammelt.

Der Harn ist dünnflüssig, blass gelbgrünlich, reagiert gegen Lackmus fast neutral. Das spezifische Gewicht des Harns beträgt 1,024.

II. Chemische Zusammensetzung des Harns.

Zur Bestimmung der festen Stoffe wurde der Harn bei Wasserbadtemperatur zur völligen Trockenheit abgedampft. Die getrockneten festen Stoffe wurden dann verascht. Auf bekannte Weise wurden die gegenseitigen Mengenverhältnisse der wasserlöslichen und wasserunlöslichen Aschenbestandteile festgestellt.

Die Befunde sind in der nachstehenden Tabelle verzeichnet.

TABELLE I.

Wassergehalt	Feste Stoffe	Organische Stoffe	Anorganische Stoffe	
			H ₂ O-lösl.	H ₂ O-unlösl.
97,933	2,067	0,378	1,674	0,015

A. ANORGANISCHE STOFFE.

Der Wasserauszug, worin die in Wasser löslichen Aschenbestandteile enthalten waren, wurde auf dem Wasserbade eingeeengt, sein Volumen durch Auffüllen in einem geeichten Messkolben bestimmt, ein aliquoter Teil davon für die Bestimmungen der einzelnen Stoffe entnommen und die dabei gefundenen Werte der Stoffe auf das Gesamtvolumen des Wasserauszugs ausgerechnet.

Die in Wasser nicht löslichen Aschenbestandteile wurden in verdünnter Salzsäure gelöst, mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen verdünnt. Ein aliquoter Teil davon wurde zu Bestimmungen der alkalischen Erden, der Schwefelsäure und der Phosphorsäure verwendet. Die Mengen der in Rede stehenden Stoffe sind zu denjenigen der in Wasserauszügen vorhandenen gleichnamigen Stoffe addiert und der Einfachheit halber nur ihre Summe in Tabelle II eingetragen.

Zur Bestimmung des Chlors bediente Verf. sich der Methode

von Volhard. Die Schwefelsäure wurde durch Salzsäure und Bariumchlorid gefällt und als Bariumsulfat abgewogen. Die Phosphorsäure wurde zuerst mit Magnesiamischung in der Kälte gefällt und dann auf bekannte Weise in das Phosphorsäuremolybdat übergeführt. Hierin wurde sodann die Phosphorsäure nach der Vorschrift von Neumann bestimmt. Der Kalk wurde aus einer mit essigsaurem Natron versetzten Lösung durch oxalsaures Ammon als oxalsaurer Kalk gefällt; durch starkes Glühen in Ätzkalk übergeführt und dann gewogen. Aus der vom Calciumoxalat abfiltrierten Lösung fällte man das Magnesium durch Übersättigung mit Ätzammoniak als phosphorsaure Ammonmagnesia aus, verwandelte die letztere auf die übliche Weise durch Glühen in pyrophosphorsaure Magnesia und berechnete daraus die Magnesia. Zur Bestimmung des Kaliums und des Natriums wurden die beiden Alkalien nach möglichster Entfernung der anderen Aschenbestandteile in Chloride übergeführt, als solche gewogen und dann das Kalium als Kaliumplatinchlorid bestimmt. Durch Subtraktion des Chlorkaliums von dem vorher gefundenen Gewichte der Summe der beiden Chloralkalien wurde die Menge des Chlornatriums gefunden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle II enthalten.

TABELLE II.

Menge des Harns	100,0 g
Gesamtasche (g)	1,6890
K ₂ O	0,0566
Na ₂ O	1,5966
CaO	0,0031
MgO	0,0268
Cl	0,7711
SO ₄	0,1845
P ₂ O ₅	0,0107

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, dass die Menge des Natriums beträchtlich gross ist und der Hauptteil desselben als Kochsalz und zum Teil als Sulfat gebunden ist.

B. ORGANISCHE BESTANDTEILE.

Der Gesamtstickstoff wurde einfach nach dem Kjeldahlschen Verfahren ermittelt. Der Prozentgehalt desselben ist im Vergleich zu anderen Tieren sehr klein. Es beträgt 0,157%.

Ich bemühte mich vergebens, aus dem Harn den Harnstoff und die Harnsäure krystallinisch zu erhalten. Nach den aus Mangel an Material nicht ganz vollständigen chemischen Versuchen halte ich es für wahrscheinlich, dass der Harnstoff nicht zu fehlen scheint und doch wenigstens zum Teil durch Harnsäure vertreten ist.

Zur Bestimmung des Kreatinins und des Kreatins wurde das kolorimetrische Verfahren von Folin und Denis angewendet. Es kann wohl keinem Zweifel unterliegen, dass bei *Chelonia japonica* nicht das Kreatinin, sondern das Kreatin für den Exkretionsstoff zu gelten habe. Das Kreatin beträgt, als Kreatinin berechnet, in 100,0 ccm Harn 22,3 mg, während das Kreatinin in 20,0 ccm Harn nicht nachweisbar ist.

Es ist eine biologisch interessante Wahrnehmung, dass der Eiweissabbau im Organismus eines kaltblütigen Wassertieres, der Meerschildkröte, zu demselben Endprodukte zu führen scheint, wie der Stoffwechsel eines Vogels.

Genauere Untersuchungen müssen fortgesetzt werden.

CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DER SCHMERLEN (MISGURNUS ANGUILLICANDATUS CANTOR).

VON

YASUSHI MARUSHIMA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität
zu Taihoku. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 8. Oktober 1942).

Die steigende Beachtung, die in letzter Zeit die tierischen Eiweiss- und Fettstoffe in der Frage der Volksernährung erfuhren, liess eine systematische chemische Untersuchung der Fische und Muscheln, speziell der für Landleute besonders wichtigen Süsswassertiere von grundsätzlichem Interesse erscheinen.

Obwohl die Schmerlen so allgemein den japanischen Speisen einen beliebten Nutzen leisten, ist bis jetzt keine genaue Mitteilung über den Nährwert dieses Tieres erschienen, desgleichen sind keine eingehenden Studien über die chemischen Eigenschaften und die chemischen Körperbestandteile angestellt worden.

Es war die Absicht des Verfassers, neben einigen quantitativen Untersuchungen in vorliegenden Studien speziell den basischen Anteilen der Extraktivstoffe seine Aufmerksamkeit zu schenken.

I. Über die N-haltigen Extraktivstoffe von Schmerlenmuskeln.

Als mein Ausgangsmaterial benutzte ich 51,15 kg Schmerlenmuskel, die mit 200 Liter kochendem Wasser extrahiert wurden, wobei man jedesmal die Flüssigkeit durch ein Tuch gepresst hat. Die vereinigten Auszüge wurden nach der Hitzekoagulation mit Tannin gefällt. Man setzt dem Filtrat so lange Bleiessig hinzu, als noch ein Niederschlag entstand. Nach dem Entbleien des Filtrates mit Schwefelwasserstoff wurde die Flüssigkeit stark eingengt. Es krystallisierte sehr bald und nach Absaugen der Krystalle und erneutem Einengen schieden sich nochmals die gleichen Krystalle

aus. Dieses Verfahren wurde wiederholt und der Erfolg war, dass zusammen 91 g fast reines Kreatin zur Abscheidung kamen.

Das Filtrat des Kreatins wurde eingengt und in 5 proz. schwefelsaurer Lösung mit 10 proz. HgSO_4 -Lösung gefällt.

A. QUECKSILBERSULFATFÄLLUNG.

Die Quecksilbersulfatfällung wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die vom Quecksilbersulfid abfiltrierte Flüssigkeit mit Baryt behandelt. Hat man den Barytüberschuss mit Kohlensäure beseitigt und das Filtrat stark eingengt, so scheiden sich daraus 17,5 g Kreatinin aus.

Die Mutterlauge des freien Kreatinins wurde eingengt und alkoholische Pikrinsäurelösung zugefügt, bis sie eine krystallinische Masse des Kreatininpikrates lieferte (1,2 g).

Das Filtrat des Kreatininpikrates wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Der von Pikrinsäure befreiten schwefelsauren Lösung wurde dann Baryt zugesetzt, der Barytüberschuss durch Kohlensäure beseitigt; die regenerierte Basenlösung wurde bis zu Sirupkonsistenz eingengt und unter Zusatz von Alkohol stark abgekühlt. Die ausgeschiedene feine Krystallmasse schmolz bei $262\text{--}267^\circ$ (unkorr.). Sie zeigten eine deutliche Paulysehe Diazoreaktion.

Hat man die Krystallmasse in wenig Wasser gelöst und mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung versetzt, so wurde sie in Pikrolonat übergeführt, das bei 163° schmolz und folgende Analysenzahlen ergab:

2,545 mg Subst.: 0,446 ccm N_2 (14° , 763 mm).

Ber. für $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_8 \cdot \text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_5 + 2\text{H}_2\text{O}$: N 21,29%

Gefunden: 20,93 "

Hat man das Pikrolonat in vacuo bei 130° getrocknet, so zeigt die Substanz folgende Analysenwerte:

3,000 mg Subst.: 0,588 ccm N_2 (27° , 767 mm).

Ber. für $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_8 \cdot \text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_5$: N 22,85%

Gefunden: 22,51 "

Auf Grund der Analyse und des Schmelzpunktes wird die

Substanz als mit Carnosin-pikrolonat identisch angenommen.

Das Filtrat der feinen Krystallmasse vom Schmelzpunkt 262–267° wurde mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung versetzt, wobei sich eine Fällung ergab, die nach dem Umkrystallisieren bei 229–231° schmolz und die für Histidin-pikrolonat stimmenden Analysenwerte lieferte. Es wurden im ganzen etwa 1,1 g dieses Salzes erhalten.

3,420 mg Subst.: 5,660 mg CO₂, 1,325 mg H₂O.

4,910 mg Subst.: 0,989 ccm N₂ (24°, 759 mm).

Ber. für C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ ·C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₅ :		Gefunden:
C	45,82 %	45,21 %
H	4,06 "	4,30 "
N	23,39 "	23,12 "
Pikronsäure	63,01 "	62,45 "

B. DAS FILTRAT DER QUECKSILBERSULFATFÄLLUNG.

Um das Quecksilber und die Schwefelsäure in dem Filtrat der Quecksilbersulfatfällung zu beseitigen, habe ich das Filtrat mit Schwefelwasserstoff und dann mit Bariumhydroxyd behandelt. Die eingeeengte Lösung wurde bei schwefelsaurer Reaktion der Fällung mit Phosphorwolframsäure unterzogen. Die Phosphorwolframsäurefällung wurde mit Baryt zersetzt, der überschüssige Baryt mit Kohlensäure beseitigt und so eine freie Lösung von kohlensauern Basen erhalten. Nach starkem Einengen der Lösung schieden sich reichliche Kristalle aus, die sich nach den chemischen Eigenschaften und Analysen mit dem Kreatinin identisch erwiesen. Im ganzen wurden 19,0 g des freien Kreatinins erhalten.

Die vom Kreatinin abfiltrierte Basenlösung wurde dann in gewohnter Weise in eine Histidin-, Arginin- und Lysinfraktion aufgeteilt.

1) Histidin-Fraktion. Die Silberfällung wurde mit verdünnter Schwefelsäure versetzt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Die vom Silbersulfid nebst Bariumsulfat abfiltrierte und durch Eindampfen vom Schwefelwasserstoff befreite Flüssigkeit wurde mit Barytwasser von Schwefelsäure und durch Kohlensäure vom Überschuss des Baryts befreit und zur Trockenheit eingedampft. Der Rückstand wurde in siedendem Wasser aufgenommen,

vom Bariumcarbonat abfiltriert und mit einer alkoholischen Lösung von Pikrolonsäure versetzt. Am anderen Tage hatten sich hellgelbe Krystallnadeln abgeschieden, welche scharf abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen, nach dem Trocknen 0,6 g wogen. Der Körper schmolz bei 232° unter Zersetzung. Die Analysen ergaben das Vorhandensein von Histidin-pikrolonat.

4,055 mg Subst.: 6,695 mg CO₂, 1,420 mg H₂O.

2,710 mg Subst.: 0,558 ccm N₂ (32°, 766 mm).

Ber. für C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ ·C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₅ :		Gefunden:
C	45,82%	45,03%
H	4,06 "	3,92 "
N	23,39 "	23,23 "

Zur Bestimmung der Pikrolonsäure und zugleich zum Nachweis von Histidin mit einer charakteristischen Farbenreaktion wurde das gewogene Pikrolonat in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure zerlegt und dann mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde abgedampft und gewogen.

Ber. für C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ ·C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₅ :		Gefunden:
Pikronsäure	63,01%	63,48%

Die von Pikrolonsäure befreite wässrige Lösung zeigt eine intensive Paulysehe Diazoreaktion. Somit kann an dem Vorkommen des Histidins in Schmerlenmuskeln nicht gezweifelt werden.

2) Arginin-Fraktion. Die Silberverbindungen dieser Fraktion wurde in verdünnter Schwefelsäure verrührt, mit Schwefelwasserstoff vom Silber und mit Barytwasser unter genauer Ausfällung von der Schwefelsäure wieder befreit. Nachdem der überschüssige Baryt mit Kohlensäure ausgefällt war, wurde das Filtrat mit alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt. Dabei schieden sich 1,10 g des Kreatininpikrates aus, die bei 212° schmolzen.

Wenn das Filtrat des Kreatininpikrates mit Schwefelsäure angesäuert, die Pikrinsäure mit Äther extrahiert, die Schwefelsäure mit Baryt entfernt und die regenerierte Lösung mit Pikrolonsäure versetzt wurde, so schieden sich 0,2 g eines Pikrolonates aus, das nach Umkrystallisieren bei 236° schmolz. Es ergab folgende

Analysendaten:

3,700 mg Subst.: 5,720 mg CO₂, 1,820 mg H₂O.2,660 mg Subst.: 0,558 ccm N₂ (25°, 766 mm).Ber. für C₈H₁₄N₄O₂·C₁₀H₈N₄O₅ + H₂O (*d*-Argininpikrolonat):

C 42,08% H 5,30% N 24,56%

Gefunden: 42,16 " 5,50 " 24,22 "

Zur Bestimmung der Pikrolonsäure wurde das gewogene Pikrolonat mit Schwefelsäure zerlegt und mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde abgedampft und gewogen. Es ergab 57,25 Pikrolonsäure, statt der berechneten 57,88. Die wässrige Lösung zeigt eine starke Sakaguchi's Farbenreaktion.

Die Ergebnisse der Analyse und der Farbenreaktion stimmen mit denen des *d*-Arginins gut überein.

3) Lysin-Fraktion. Das Filtrat der Silber-Baryt-Fällung wurde mit Schwefelsäure angesäuert, durch Schwefelwasserstoff vom Silber befreit, filtriert vom Silbersulfidniederschlag, mit Schwefelsäure bis zu einem Gehalt von 5 proz. versetzt und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Diese Fällung wurde dann mit Barytwasser zerlegt, das Filtrat durch Kohlensäure vom Baryt befreit, bis zur Trockenheit eingedampft, mit Wasser aufgenommen und filtriert. Man fügte dieser Lösung solange kleine Portionen alkoholischer Pikrinsäurelösung zu, als noch feuchtes Lackmuspapier nicht gerötet wurde. Es schieden sich zunächst 0,4 g Kreatininpikrat aus. Beim Einengen des Filtrates bekam man noch 0,3 g des Pikrates, das keine Kreatininreaktion ergab und bei 226° schmolz.

Das Pikrat ergab die folgenden Analysendaten:

4,055 mg Subst.: 5,330 mg CO₂, 1,275 mg H₂O.2,720 mg Subst.: 0,467 ccm N₂ (24°, 757 mm).Ber. für C₈H₁₄N₂·(C₆H₃N₃O₇)₂:

Gefunden:

C 36,42% 35,85%

H 3,59 " 3,52 "

N 19,99 " 19,65 "

Aus den Analysendaten geht hervor, dass die Substanz aus Cadaverindipikrat bestand.

Wenn man das Filtrat des oben geschilderten Pikrates vollständig auskrystallisieren liess, blieb eine harzige Masse zurück, die indessen allen Versuchen, zu einem krystallinischen Körper zu gelangen, hartnäckig trotzte. So wurde die harzige Masse unter Anwendung von Salzsäure und Äther in einen Sirup von Chloriden verwandelt, die man mit alkoholischer Platinchloridchlorwasserstoffsäure fällte. So erhielt man nach dem Umkrystallisieren der Fällung ein schönes Chloroplatinat in einer Menge von 0,9 g, welches bei 251° schmolz.

4,825 mg Subst.: 0,193 cem N₂ (31°, 761 mm).

0,0388 g Subst.: 0,116 g Pt.

Ber. für (C ₅ H ₁₁ NO ₂) ₂ ·H ₂ PtCl ₆ :		Gefunden:
N	4,35%	4,50%
Pt	30,27 "	29,89 "

Es unterliegt kaum einem Zweifel, dass die hier erhaltene Substanz mit dem Betain identisch ist.

TABELLE I.

Aus 51,15 kg frischen Schmerlenmuskeln					
Fraktion	Extraktstoffe	Freie Substanz oder Salze	Schmp.	Ausbeute als	
				Kristallin-Form	freie Subst.
Enteweisste Lösung	Kreatin	frei		91,0g	91,0g
HgSO ₄ -Fällung	Kreatinin	frei		17,5g	} 37,6g
HgSO ₄ -Fällung	"	Pikrat	212°	1,8g	
Filtrat der HgSO ₄ -Fällung (PWS-Fällung)	"	frei		19,0g	
	"	Pikrat	212°	1,1g	
Arginin-Fr.	"	Pikrat	212°	0,4g	} 0,63g
Lysin-Fr.	"	Pikrat	212°	1,1g	
HgSO ₄ -Fällung	Histidin	Pikrolonat	231°	0,6g	
Histidin-Fr.	"	Pikrolonat	232°	0,2g	
Arginin-Fr.	Arginin	Pikrolonat	236°	0,9g	0,084g
Lysin-Fr.	Betain	Platinat	251°	0,5g	0,327g
HgSO ₄ -Fällung	Carnosin	frei	262°	0,3g	0,5g
Lysin-Fr.	Cadaverin	Dipikrat	226°		0,146g

Somit ist das Vorkommen von Kreatin, Kreatinin, Histidin, Arginin und Betain im Schmerlenmuskel erwiesen. Ausserdem wurden noch zwei Verbindungen isoliert. Eine Verbindung schmilzt bei 262–267°, zeigt Paulysche Diazoreaktion und hat eine summarische Formel von Carnosin. Die andere wurde in der Lysin-Fraktion als Pikrat isoliert, dessen Analysendaten mit denen des Cadaverin-dipikrat übereinstimmen.

Die Gesamtmenge der aus Schmerlenmuskeln krystallinisch rein isolierten Extraktivstoffe ist in Tabelle I zusammengestellt.

Der tatsächliche Gehalt an den erwähnten Körpern in dem Muskelgewebe von Schmerlen ist sicherlich wesentlich grösser.

II. Mineralbestandteile der Schmerleneier.

Hinsichtlich der Mineralbestandteile des Eies hat man im hiesigen Institut bei Vogel-, Reptilien-, Amphibien-, Cephalopoden-, Gastropoden- und Ameiseneiern (1929–1941) einerseits eine merkwürdige Ähnlichkeit beobachtet, während andererseits seine auffallende Artspezifität festgestellt wurde. So z. B. ist der Gehalt der Schlangeneier an Kalk und Phosphor beträchtlich gross. Auch ist das Quantum der Alkalimetalle des Ameiseneies im Vergleich zu anderen Tierarten prozentual etwa zwanzigfach so gross.

Um einen Beitrag zur Kenntnis der Mineralbestandteile des Eies von Süsswassertieren zu liefern, wurde im Anschluss an die bereits erwähnten Beobachtungen bei verschiedenen Tierarten der Versuch unternommen, die anorganischen Bestandteile im Schmerlenei festzustellen.

25,355 g frische Schmerleneier wurden nach Zerkleinerung zunächst im Trockenschrank, dann im Exsiccator völlig getrocknet und auf bekannte Weise verascht.

Der Wasserauszug, worin nur die in Wasser löslichen Aschenbestandteile enthalten waren, wurde auf dem Wasserbade eingengt, sein Volumen durch Auffüllen in einem geeichten Messkolben bestimmt, ein aliquoter Teil davon für die Bestimmungen der einzelnen Stoffe entnommen und die dabei gefundenen Werte der Stoffe auf das Gesamtvolumen des Wasserauszugs ausgerechnet.

Die in Wasser nicht löslichen Aschenbestandteile löste man in

verdünnter Salzsäure, verdünnte mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen und verwendete einen aliquoten Teil zu Bestimmungen der alkalischen Erden, der Schwefelsäure und der Phosphorsäure. Die Mengen der in Rede stehenden Stoffe sind zu denjenigen der in Wasserauszügen vorhandenen gleichnamigen Stoffe addiert und der Einfachheit halber nur ihre Summe in folgender Tabelle eingetragen. Der in Salzsäure nicht lösliche Rückstand wurde nach dem Verfahren von Gonnermann (1917) auf Kieselsäure verarbeitet.

Zur Bestimmung des Chlors wurde die Volhardschen Methode angewendet. Die Schwefelsäure wurde durch Salzsäure und Bariumchlorid gefällt und als Bariumsulfat abgewogen. Die Phosphorsäure wurde zuerst mit Magnesiamischung in der Kälte gefällt und dann auf bekannte Weise in das Phosphorsäuremolybdat übergeführt. Hierin wurde sodann die Phosphorsäure nach der Vorschrift von Neumann titrimetrisch bestimmt. Der Kalk wurde aus einer mit essigsaurem Natron versetzten Lösung durch oxalsaures Ammon als oxalsaurer Kalk gefällt, durch starkes Glühen in Ätzkalk übergeführt und dann gewogen. Aus der vom Calciumoxalat abfiltrierten Lösung fällte man das Magnesium durch Übersättigung mit Ätzammoniak als phosphorsaure Ammonmagnesia aus, verwandelte die letztere auf die übliche Weise durch Glühen

TABELLE II.

Menge d. verwendeten Materials	25,355 g	
Menge der Trockensubstanz	6,397 g	25,23%
Aschenbestandteile:	in g	% d. Trockensubst.
Na ₂ O	0,003	0,046
K ₂ O	0,005	0,078
CaO	0,027	0,422
MgO	0,033	0,515
Cl	0,034	0,531
H ₂ SO ₄	0,030	0,469
P ₂ O ₅	0,312	4,877
SiO ₂	0,007	0,109

in pyrophosphorsaure Magnesia und berechnete daraus die Magnesia. Zur Bestimmung des Kaliums und des Natriums wurden die beiden Alkalien nach möglichster Entfernung der anderen Aschenbestandteile in Chloride übergeführt, als solche gewogen und dann das Kalium als Kaliumplatinchlorid bestimmt. Durch Subtraktion des Chlorkaliums von dem vorher gefundenen Gewichte der Summe der Chloralkalien wurde die Menge des Chlornatriums gefunden.

Die quantitative Zusammensetzung der einzelnen anorganischen Bestandteile lässt sich aus Tabelle II ersehen.

Aus der Tabelle geht hervor, dass die Phosphorsäure überwiegend darin vertreten ist.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Unter den stickstoffhaltigen Extraktivstoffen des Schmerlenmuskels steht das Kreatin im Vordergrund. Das Kreatinin, das in frischen, ruhenden Muskeln höherer Tiere nur in kleineren Mengen vorkommt, tritt bei Schmerlen in grösseren Quantitäten auf.

2. Interessanterweise kommen zwei Hexonbasen (Histidin und Arginin) unter den Muskelextraktivstoffen in freiem Zustande vor.

3. Das Betain, das im Fischfleisch schon von Kutscher (1909) aufgefunden wurde, wurde gleichfalls aus Schmerlenmuskeln erhalten.

4. In den Schmerlenmuskeln finden sich kleine Quantitäten (0,001 Proz.) von Carnosin, das nach der ersten Untersuchung von Gulewitsch und Amiradzibi (1900) bei Säugetieren mit dem Kreatin zu den wichtigsten Muskelbestandteilen gehört.

5. Eine kleine Menge von Cadaverin wurde als Chloroplatinat isoliert. Jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass etwa ein Teil desselben der postmortalen Einwirkung von Bakterien auf Lysin seine Entstehung verdankte.

6. Einzelne Mineralbestandteile der Schmerleneier wurden quantitativ ermittelt. Nach meiner Untersuchung steht der Phosphor im Vordergrund, dann kommen Magnesium und Chlor.

TABELLE III.

Tierarten	Prozentgehalt im ganzen Einhalt			Untersucher
	P ₂ O ₅	MgO	Cl	
1. Vogel: Huhn	0,294	0,045	0,096	Iseki, T. (1930)
2. Reptilien: a. Schildkröte Meerschilddröte	0,348	0,08	0,140	Karashima, J. (1929)
b. Schlangen Naja naja atra	1,802	0,069	0,063	Fukuda, S. (1939)
Elaphe tainerius	1,425	0,068	0,059	
3. Amphibien: a. Hynobius	0,136	0,040	—	Takamatsu, M. (1935)
b. Rissensalamander	0,644	—	—	Iseki u. Kumon (1933)
4. Cephalopoden: Lauzenkalmar	0,527	0,165	0,618	Kamachi, T. (1936)
5. Gastropoden: Landschnecke	0,251	0,022	0,055	Fukuda, S. (1939)
6. Insekten: Ameisen	0,419	0,066	0,960	Inamura u. Motomura (1941)
7. Fisch: Schmerlen	1,230	0,131	0,134	Marushima, Y. (1942)

Stellt man die Aschenbestandteile in Eiern von verschiedenen Tierarten einander gegenüber, so findet sich ein auffallender Hochgehalt des Phosphors einerseits in Schmerleneiern und andererseits in Schlangeneiern. Tabelle III zeigt den Vergleich.

LITERATUR.

- Gulewitsch, W. u. Amiradzibi, S. (1900): H-S. **30**, 565.
Imamura, H. u. Motomura, S. (1941): H-S.
Iseki, T. (1930): H-S. **188**, 189.
Iseki, T. u. Kumon, T. (1933): Diese Zs. **17**, 409.
Kamachi, T. (1936): H-S. **238**, 91.
Karashima, J. (1929): Diese Zs. **10**, 369.
Kumon, T. (1933): Diese Zs. **18**, 145.
Kutscher, Fr. (1909): H-S. **63**, 104.
Takamatsu, M. (1935): Diese Zs. **22**, 203.

CHEMIE DES MALARIAHARNES.

VON

YASUSHI MARUSHIMA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität
zu Taihoku. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 8. Oktober 1942)

Nachdem Arnold(1909) zuerst das Vorkommen von Nephrorosein im Harn der Scharlachkranken beobachtet hatte, konnte M. Tomita (1940) dasselbe im Malariaharn nachweisen und er machte darauf aufmerksam, dass das Verschwinden dieser Verbindung im Harn einen sicheren Massstab des Heilungsbeweises dieser Krankheit vorstellt.

Aus dem Spektrumbild scheint das Nephrorosein eine durch Ringsprengung des Porphyrins im Hämoglobinkern entstandene Tetrapyrrenverbindung zu sein. Ist demnach die Hämoglobinzersetzung und nachträgliche Nephroroseinbildung vermutet, so werden sie noch wahrscheinlicher durch Isolierung irgendeines Spaltungsprodukte des Blutfarbstoffes in einer krystallisierten und analysierbaren Form, sei es als Chromogen oder als Bruchstücke des Globins.

Von diesem Gesichtspunkte aus habe ich eine Reihe von Harnanalysen bei Malaria angestellt, hierbei wurde die Prüfung zuerst auf Antoxyproteinsäure, Oxyproteinsäure und Hexonbasen gerichtet.

Durch die Freundlichkeit von Herrn Dr. N. Okumura in hiesiger psychiatrischer Klinik gelangte ein grosses Quantum von Malariaharn in meinen Besitz, den die mit Malaria tertiana zu Kurzwecken infizierten Patienten von progressiver Paralyse beim Fieberanfall gelassen hatten.

EXPERIMENTELLE BELEGE.

Der frisch gelassene Malariaharn, dessen Nephroroseinreaktion

nach Tomita stark positiv ausfällt, wurde gesammelt. 59,1 Liter desselben wurden mit Essigsäure schwach angesäuert, auf dem Wasserbade bis zu dünnem Sirup eingedampft und solange mit Bleiessig versetzt, bis keine Fällung mehr auftrat. Das Filtrat wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, das Filtrat vom Bleisulfat in vacuo eingeengt und mit kaltgesättigtem Barytwasser versetzt. Nach der Beseitigung des überschüssigen Baryts durch CO_2 wurde die Lösung unter vermindertem Druck stark eingeengt und tropfenweise in absoluten Alkohol eingegossen. Die Alkohol-fällung wurde zur Trennung der Antoxyproteinsäure und Oxyproteinsäure benutzt und das Filtrat zum Zwecke der Hexonbasen-untersuchung reserviert.

I. TRENNUNG DER ANTOXYPROTEINSÄURE.

Die Alkohol-fällung wurde in Wasser gelöst, vom Barium durch verdünnte Schwefelsäure befreit, mit 20proz. Quecksilberacetat versetzt; es entstand ein weisser Niederschlag. Diese Niederschläge wurden in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus der von Quecksilbersulfid abfiltrierten Lösung wurden anorganische Salze nach starkem Einengen der Lösung durch Eingiessen in absoluten Alkohol gefällt. Unter Zusatz von Schwefelsäure wurde das alkoholische Filtrat unter vermindertem Druck eingedampft, um die darin enthaltene Essigsäure zu verjagen. Der Sirup wurde in Wasser gelöst, mit Barytwasser gesättigt und in vacuo eingedampft. Diese Behandlung hat man wiederholt, damit das Ammoniak vollständig vertrieben wurde. Nach der Beseitigung des Barytüberschusses mit Kohlensäure, sowie dem Einengen der Flüssigkeit in vacuo bis zu Sirup wurde die Antoxyproteinsäure durch Eingiessen in absoluten Alkohol als Bariumsalz gefällt. Weitere Reinigung der Antoxyproteinsäure wurde nach dem Verfahren von Bondzinski (1905) ausgeführt. Die Gesamtausbeute an Bariumsalz dieser Säure betrug 18,7 g.

0,1948 g Substanz, verbrannt nach Kjeldahl, verbrauchten 19,3 ccm $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$, entsprechend 0,0270 g $N=13,87\% N$.

Durch diese Analysenzahl sowie ihre Eigenschaften kann die Substanz als antoxyproteinsaures Barium angenommen werden.

II. TRENNUNG DER OXYPROTEINSÄURE.

Nach der Abtrennung der Antoxyproteinsäure mit Quecksilberacetat wurde die Lösung mit Natriumcarbonatlösung so lange versetzt, bis kein Niederschlag mehr ausfiel. Der abgesaugte Niederschlag wurde in Wasser suspendiert und unter Durchleitung von Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Quecksilbersulfid unter vermindertem Druck zu Sirup eingedampft und dann mit absolutem Alkohol versetzt, um anorganische Salze zu beseitigen. Nach Entfernung der Essigsäure durch wiederholtes Abdampfen mit Schwefelsäure wurde der Rückstand in Wasser gelöst und mit Barytwasser übersättigt. Das Filtrat von Bariumsulfat wurde dann mit Kohlensäure behandelt. Nun wurde das Filtrat vom Bariumcarbonat stark eingeeengt und in absoluten Alkohol eingegossen. Dabei fielen weisse Niederschläge aus. Durch wiederholtes Auflösen in Wasser und Umfällen mit Alkohol wurde das Bariumsalz gereinigt. Die Ausbeute betrug 11,1 g.

0,4832 g Bariumsalz gaben 0,2556 g $\text{BaSO}_4 = 0,1508 \text{ g Ba}$, entsprechend 31,20% Ba.

0,5456 g Substanz, verbrannt nach Kjeldahl, verbrauchten 38,1 ccm $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$, entsprechend 0,0533 g $N = 9,77\% N$.

Diese Verbindung zeigt weder Ehrlichsche Diazoreaktion noch eine Biuretreaktion.

Die Analysenzahlen und Eigenschaften dieser Substanz stimmen mit denen der Oxyproteinsäure von Bondzinski (1905) gut überein.

III. ISOLIERUNG DER HEXONBASEN.

Das oben beschriebene Filtrat der Alkoholfällung (I) und das Filtrat des Quecksilbersalzes der Oxyproteinsäure wurden vereinigt, das gelöste Quecksilber mit Schwefelwasserstoff beseitigt und das Filtrat vom Quecksilbersulfid unter vermindertem Druck stark eingeeengt. Dabei fielen reichliche anorganische Niederschläge aus. Das von anorganischen Salzen möglichst befreite Filtrat wurde eingedampft, der Rückstand in 5% H_2SO_4 gelöst und mit Phosphorwolframsäure gefällt.

Die Phosphorwolframsäure-Fällung wurde mit Baryt zerlegt und die frei gewordenen Hexonbasen nach dem Vorschlag von Kossel u. Kutscher (1900) für die quantitative Bestimmung aufgearbeitet.

Es ergab sich:

Histidin	0,12 g (als Pikrolonat)
Arginin	0,07 g (als Pikrolonat)
Lysin	Spur

Analyse:

a) Histidinpikrolonat.

2,237 mg Subst.:	0,451 ccm N ₂ (27°, 760 mm)	
Ber. für C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ ·C ₁₀ H ₄ N ₄ O ₅ :		N 23,39
Gefunden:		22,91

b) Argininpikrolonat.

2,665 mg Subst.:	0,534 ccm N ₂ (14°, 767 mm)	
Ber. für C ₆ H ₁₁ N ₄ O ₂ ·C ₁₀ H ₄ N ₄ O ₅ + H ₂ O:		N 24,56
Gefunden:		24,05

ZUSAMMENFASSUNG.

Es wurde eine quantitative Bestimmung jener Stickstoff-Fraktion des Malariaharns ausgearbeitet, welche die Gruppen von Antoxyproteinsäure, Oxyproteinsäure und Hexonbasen umfassen.

Der Vergleich der Mengenverhältnisse dieser Verbindungen im Harn bei Malaria und anderen akuten Infektionskrankheiten ergab folgendes:

TABELLE I.

Enthaltene Substanz	In 1 Liter Harn von			
	Malaria	Typus	Scharlach	Masern
Antoxyproteinsäure	0,2200g	1,7300g	0,7400g	0,6800g
Oxyproteinsäure	0,1300	0,3500	0,1100	0,4400
Histidin	0,0097	0,0002	0,0020	0,0004
Arginin	0,0005	0,0080	0,0080	0,0220
Lysin	Spur	0,0130	0,0250	0,0300
Untersucher	Marushima	Sendju (1927)	Nakayama (1934)	Nakayama (1934)

Wie ein Blick auf die Tabelle lehrt, ist die Steigerung der Antoxyproteinsäuremenge viel unbeträchtlicher als bei anderen Diazoharnen.

Das Histidin im Malariaharn überwiegt seiner Menge nach die Menge sämtlicher anderer Hexonbasen. Das Lysin war nur spurweise nachweisbar. Bei anderen Infektionskrankheiten (Typhus, Scharlach, Masern) fanden sich hinsichtlich der Grössenordnung der Hexonbasen ganz andere Verhältnisse. Das Lysin scheidet sich dabei am reichlichsten aus, es stieg bis auf 0,003%.

Man könnte sich also versucht fühlen, eine pathologische Veränderung der Harnbestandteile bei Malaria im Gegensatz zu anderen akuten Infektionskrankheiten nicht bloss auf eine Gesamteiweisszersetzung, sondern vielmehr auf Erythrocytenzerfall zurückzuführen, wenn einer solchen Auffassung nicht Bedenken entgegenstehen würden.

Das eine derselben bezieht sich auf das Untersuchungsmaterial. Bei obigen Untersuchungen wurde das Material ausschliesslich von den Patienten von progressiver Paralyse geliefert, die an Malaria tertiana litten.

Wir müssen also weiter die Harnanalyse einerseits bei progressiver Paralyse und andererseits bei einfacher Malaria anstellen. Chemische Untersuchungen, aus dem Amylalkoholextrakte des mit Salpetersäure angesäuerten Malariaharns, der die ein typisches Spektrumbild des Nephroroseins erzeugende Substanz enthält, das Nephrorosein oder seine Derivate in krystallinischer Form zu isolieren, sind auch unerlässlich.

Diesbezügliche Versuche sind schon im Gange.

LITERATUR.

- Arnold, (1909): H-S. **61**, 240.
Bondzinski u. Dombrowski, (1905): H-S. **46**, 83.
Kossel, A. u. Kutscher, Fr. (1900): H-S. **31**, 165.
Nakayama, S. (1934): Diese Zs. **19**, 33.
Nakayama, S. (1935): Diese Zs. **21**, 439.
Sendju, Y. (1927): Diese Zs. **7**, 311.
Tomita, M. (1940): Taiwan Igakkai Zassi **39**,
Tomita, M. (1941): Taiwan Igakkai Zassi **40**, 96.

ÜBER DAS AUFTRETEN DER MILCHSÄURE IM HARN NACH DEM KARDIAZOLKRAMPF.

VON

HIROYUKI IMAMURA UND SHUN WAKESHIMA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut und der psychiatrischen
Klinik der Universität zu Taihoku.)

(Eingegangen am 8. Oktober 1942)

Vor mehreren Jahren haben K. Inouye und T. Saiki (1902) die Untersuchungen über die Beschaffenheit des nach dem epileptischen Anfall entleerten Harns ausgeführt und gefunden, dass eine Milchsäureausscheidung dabei stattfindet. Nach diesem Befund vermuteten sie, dass die Ausscheidung der Milchsäure eine direkte notwendige Folge des Sauerstoffmangels sei.

Da die starken Krämpfe stets eine Veranlassung zur Entstehung allgemeinen Sauerstoffmangels geben, so kann man mit vollem Rechte das Vorkommen der Milchsäure im Harn erwarten, der nach den durch verschiedene Momente hervorgerufenen Krämpfen gelassen wird.

Wir waren im Stande, eine reichliche Menge des Harns zu bekommen, der in den nächsten Stunden nach starkem Kardiazolkrampf gelassen wurde, und es gelang uns, Rechtsmilchsäure aus dem Harn zu isolieren.

66 Liter des nach dem Kardiazolkrampf entleerten Harns wurden zu Sirup eingedampft und mit einem 10 fachen Volumen 95 proz. Alkohol vermischt. Nach 24 stündigem Stehenlassen wurde die Lösung abfiltriert, das Filtrat verdunstet und der Rückstand mit absolutem Alkohol erschöpft. Von dieser Lösung wurde nun der Alkohol abdestilliert, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und unter Zusatz von Schwefelsäure 72 Stunden lang im Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Der Ätherauszug wurde mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Der Äther wurde abdestilliert, der Rückstand in wenig Wasser gelöst, eine Stunde auf dem Wasserbade mit Bleicarbonat erhitzt, filtriert

und das Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt. Man engte dann die von Schwefelblei abfiltrierte Flüssigkeit stark ein, um den gelösten Schwefelwasserstoff zu vertreiben. Durch Kochen der eingeeengten Flüssigkeit mit Zinkcarbonat wurden 2,5 g Zinklaktat erhalten.

0,2099 g Substanz verloren bei 110° 0,0271 g Gewicht,
 3,225 mg Substanz gaben 3,050 mg CO₂ und 1,485 mg H₂O,
 3,893 mg Substanz gaben 3,670 mg CO₂ und 1,780 mg H₂O.

Berechnet für (C ₃ H ₅ O ₃) ₂ Zn + 2H ₂ O:		Gefunden:
C	25,76%	25,78%
		25,71 "
H	5,05 "	5,11 "
		5,07 "
H ₂ O	12,88 "	12,91 "

Für die optischen Bestimmungen wurden 0,1770 g lufttr. Zinksalz in Wasser gelöst und auf 10 ccm aufgefüllt. Drehte bei 20° und Natriumlicht im 1 dm-Rohr 0,12° nach links. Mithin $[\alpha]_D^{20} = -6,98^\circ$.

Auf Grund der Analyse und der optischen Bestimmung wurde bestätigt, dass die im Harn ausgeschiedene Substanz nichts anderes als Fleischmilchsäure ist.

Trotz sorgfältigen Suchens nach dem Kardiazol oder seinen Umwandlungsprodukten wurden solche doch nicht gefunden.

LITERATUR.

Inouye, K. u. Saiki, T. (1902): Zs. f. physiol. Chem. **37**, 203.

ÜBER DEN RESPIRATORISCHEN STOFFWECHSEL BEIM EMBRYO DER REPTILIEN.

VON

MASAJI TOMITA UND TOSIO TANAKA.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der
Universität zu Taihoku.)*

(Eingegangen am 8. Oktober 1942)

Der Stoffwechsel des Säugetierembryos ist nur höchst unvollständig bekannt, weil technische Schwierigkeiten der Untersuchung wesentliche Hindernisse bereitet haben. Der embryonale Gaswechsel ist am besten an bebrüteten Hühnereiern studiert worden, besonders mit gut ausgebildeter Methode von Bohr und Hasselbalch (1900–1903), die fanden, dass die Kohlensäurebildung und der Sauerstoffverbrauch des sich entwickelnden Hühnchens dem Gewicht nach annähernd parallel gehen, und dass der Sauerstoffverbrauch die Kohlensäurebildung überwiegt und der respiratorische Quotient im Mittel 0,7 beträgt.

In chemischer Hinsicht beruhen die Ursachen der Differenzen in respiratorischen Quotienten auf Verschiedenheiten des organischen Materials, das jeweils zur Verbrennung kommt, bzw. auf den verschiedenen Verhältnissen, in denen Eiweiss, Fett und Kohlehydrate jeweils gemischt sind. Der respiratorische Quotient gibt uns also ein Mittel, um annähernd die Natur der gerade im Körper zerfallenden Stoffe zu erkennen. Wir können demnach schliessen, dass der Stoffumsatz beim Hühnerembryo vorzugsweise durch Zersetzung von Fett erfolgt.

Eine Gutachten darüber, wie viel des Stoffwechsels mit Wahrscheinlichkeit dem einen, und wie viel dem anderen Vorgange anzurechnen ist, bietet aber, besonders rücksichtlich der Embryonen von Warmblütern, sehr bedeutende Schwierigkeiten dar. Anders stellen sich die Verhältnisse hinsichtlich der Kaltblüter. Hier kann die Entwicklung innerhalb eines weit grösseren Temperaturinter-

valles stattfinden, und es ist deshalb zu erwarten, dass auch die Intensität des Wachstums des Embryos bei diesen Tieren den äusseren Bedingungen gemäss variieren kann, ohne dass darum eine normale Entwicklung ausgeschlossen wäre. Der Stoffwechsel bei den Kaltblütern ist überhaupt weniger intensiv als bei den Warmblütern, und es ist daher von Interesse, zu untersuchen, ob dieser Unterschied sich auch auf den Stoffwechsel des Embryos erstreckt.

Eine Schätzung der Intensität des Stoffwechsels oder der Grösse desselben pro Stunde und pro kg des Gewichtes des Embryos, die ja für den Vergleich zwischen Embryonen verschiedenen Alters und dem erwachsenen Tiere erforderlich ist, lässt sich indes nicht durch Untersuchung holoblastischer Eier erzielen; hierzu müssen notwendiger Weise meroblastische Eier wie der Reptilieneier angewandt werden, wo die Embryo sich von dem übrigen Eiinhalt trennen lässt.

Da es nun nicht immer leicht ist, eine zur Untersuchung ausreichende Menge Reptilieneier zu beschaffen, so blieben sie bei embryochemischen Studien bisher ganz unberücksichtigt. Unseres Wissens ist in der Literatur nur eine, auf die Bestimmung des respiratorischen Stoffwechsels des Reptilienembryos gerichtete Versuchsreihe zu finden; diese rührt von Bohr (1904) her, der in seiner Arbeit übrigens eine Anzahl der Respirationsversuche des Ringelnatterembryos in einer kurzen Entwicklungsperiode ausgeführt hat. An Versuche dieser Art ist die Forderung zu stellen, dass die Dauer der einzelnen Bestimmung keine gar zu kurze ist, sondern die Versuche müssen an Eiern verschiedener Entwicklungsperioden mehrere Stunden hindurch ausgeführt werden, und endlich muss zur Feststellung des respiratorischen Stoffwechsels selbstverständlich eine völlig zuverlässige Methode angewandt werden.

Von der obigen Erwägung ausgehend, haben wir eine Reihe der Respirationsversuche an sich entwickelnden Kobraeiern einerseits und an denselben der Meerschildkröte andererseits ausgeführt. Das Verhalten der chemischen Zusammensetzung der Eier dieser beiden Tiere bei der Bebrütung haben wir schon (1929–1939) ziemlich eingehend untersucht.

Die Versuchsmethode besteht ihrem Prinzipie nach darin, dass das Ei sich in einem luftdicht schliessenden Kasten befindet, durch den ein ununterbrochener Strom kohlensäurefreier atmosphärischer Luft gesaugt wird. Die in unserem Laboratorium zur Bestimmung benutzte Methode für Schlangeneier ist genau von Dr. K. Fujimoto (1935) für kleine Tiere ausgearbeitet und genau beschrieben worden. Fujimoto's Apparat ist dem Prinzipie nach in derselben Weise eingerichtet, wie der Knipping'sche und auch der Benedict'sche zu vollständigen Respirationsversuchen.

Kobra (*Naja Naja Atra*) legt ihre Eier auf gefallene Blätter im Felsen- oder Baumschatten ab. Die Tiere legen gewöhnlich 14 bis 18 Eier. Die Jungen schlüpfen je nach der Temperatur nach Verlauf von 5–6 Wochen aus. Während die künstliche Bebrütung nicht leicht war, weil die Entwicklung der meisten Schlangeneier von dem Feuchtigkeitsgrade des sie umgebenden Mediums abhängig war, waren die Kobraeier gegen äusseren Bedingungen sehr widerstandsfähig und es bot keine grosse Schwierigkeit dar, sie künstlich zu bebrüten.

16 frische Kobraeier wurden zusammen in dem Respirationskasten stehen gelassen. Wegen Mangels an Vorbereitungsversuchen konnten wir leider keine Schlussexperimente bis zum 15. Bebrütungstage ausführen. Nachher wurde jeden Tag oder alle 2 Tage ein Versuch angestellt, der gewöhnlich 4–7 Stunde dauerte. Die Temperatur des Versuchszimmers zeigte keine grosse Schwankung, sie blieb fast konstant zwischen 25°–30°. Am 39. Bebrütungstage fand die erste Ausschüpfung statt. Die lebend ausgeschüpften Jungen wurden sofort aus dem Respirationskasten herausgenommen und nur, mit den noch nicht ausgeschüpften Eiern weitere Respirationsversuche angestellt. 4 Eier blieben ohne auszuschüpfen zurück, obwohl die Embryonen darin schon völlig zu normaler Grösse entwickelt waren.

Es ist übrigens ein Zeugnis von der Brauchbarkeit der ganzen Versuchsanordnung, dass es gelang, an denselben 16 Eiern 40 Tage hindurch die Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureproduktion kontinuierlich zu bestimmen und darauf 12 lebensfähige Schlangen fast gleichzeitig aus den Eiern zu erhalten.

Im Folgenden geben wir erst eine Beschreibung der einzelnen Respirationsversuche kurz zusammengefasst in Tabelle I.

TABELLE I.

Datum des Versuches (1940)	Tage der Bebrütung	Zahl der verwendeten Eier	Dauer d. einzeln. Versuche (St.)	Temper. beim einzeln. Versuche	Auf 0°, 760 mmHg ungerechnet		Pro 1 Ei, pro St. berechnet		$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
					O ₂ -Aufnahme (cem)	CO ₂ -Abgabe (cem)	O ₂ -Aufnahme (cem)	CO ₂ -Abgabe (cem)	
1. 9.	16	16	11	27,1°	145,0	113,0	0,82	0,64	0,78
2. 9.	17	16	5	25,7°	92,5	53,0	1,15	0,66	0,57
4. 9.	19	16	5	26,6°	101,0	53,0	1,26	0,66	0,52
6. 9.	21	16	5	26,8°	79,2	52,5	0,99	0,65	0,65
7. 9.	22	16	9	26,4°	167,0	128,0	1,15	0,88	0,75
8. 9.	23	16	10	24,8°	162,0	103,0	1,01	0,64	0,63
9. 9.	24	16	6	27,1°	129,0	90,5	1,34	0,94	0,70
10. 9.	25	16	5	25,2°	86,5	59,5	1,08	0,74	0,68
11. 9.	26	16	4	26,6°	59,0	46,3	0,92	0,72	0,78
13. 9.	28	16	5	29,0°	118,0	92,0	1,47	1,15	0,78
15. 9.	30	16	5	29,5°	140,5	91,0	1,75	1,13	0,64
17. 9.	32	16	3	27,5°	71,2	50,5	1,48	1,05	0,70
18. 9.	33	16	3	29,2°	99,0	64,0	2,06	1,33	0,64
20. 9.	35	16	7	28,2°	158,0	103,0	1,41	0,92	0,65
22. 9.	37	16	7	28,2°	154,0	122,5	1,37	1,09	0,79
23. 9.	38	16	7	29,0°	108,0	96,5	0,96	0,86	0,89
24. 9.	39	14	3	29,5°	80,1	51,7	1,90	1,23	0,64
25. 9.	40	7	6	29,0°	95,5	60,5	2,27	1,44	0,63

Es geht aus obigen Versuchen hervor, dass der Sauerstoffverbrauch immer die Kohlensäurebildung überwiegt und der respiratorische Quotient durchschnittlich 0,69 beträgt. Im Gegensatz zum Hühnerei gehen die Sauerstoffaufnahme und die Kohlensäureproduktion des Kobraeies dem Gewicht des sich entwickelnden Embryos nicht parallel.

Am 38. Bebrütungstage, also kurz vor dem Ausschüpfen stieg der respiratorische Quotient plötzlich bis auf 0,89. Sieht man nun von den ungünstigen Bedingungen der Versuche in der Endperiode

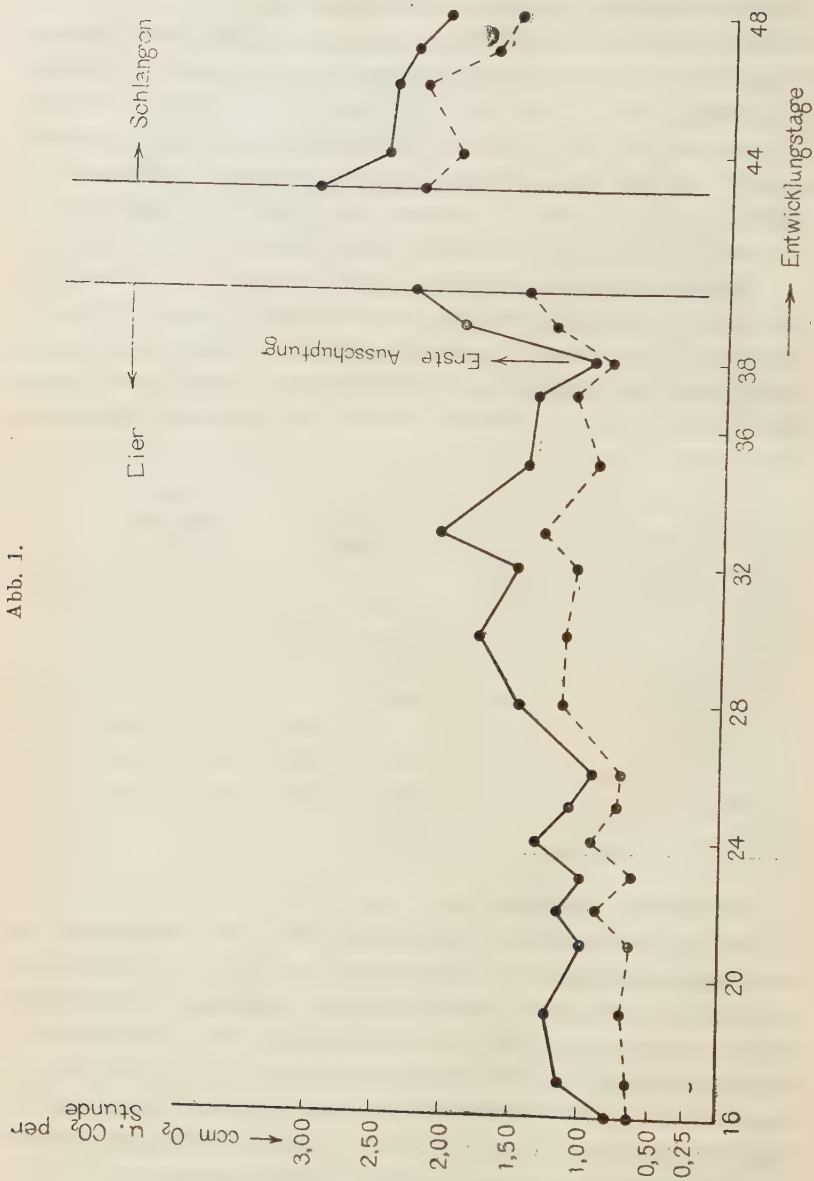
der Bebrütung ab, die dadurch entstanden, dass der respiratorische Stoffwechsel der 4 Eier vor der Beendigung des Versuches aufhörte, so besteht weiter die Möglichkeit, dass die Dekompositionsprodukte des toten Eies für Stoffwechselprodukte des lebenden Embryos angenommen werden. Die Ergebnisse werden dabei ungenau gemacht und wir können keine ausschlaggebenden Schlüsse ziehen, da ein gemischter Umsatz kurz vor dem Ausschüpfen entstand, an welchem Kohlehydrate wesentlich beteiligt sind.

Es war jedoch noch möglich, einen Vergleich des Stoffwechsels des Embryos mit dem des völlig entwickelten jungen Tieres anzustellen. Zu diesem Zwecke wurden eine Reihe Respirationsversuche bei der Inanition an den ausgeschüpften jungen Tieren unternommen, die 2-5 Tage alt waren. Es zeigte sich folgendes:

TABELLE II.

Datum des Versuches (1940)	Zahl der verwendet. Tiere	Dauer d. einzeln. Versuche (St.)	Temper. beim einzeln. Versuche	Auf 0°, 760 mmHg umgerechnet		Pro 1 Tier, pro St. berechnet		$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
				O ₂ -Aufnahme (ccm)	CO ₂ -Abgabe (ccm)	O ₂ -Aufnahme (ccm)	CO ₂ -Abgabe (ccm)	
28. 9.	12	5	28,5°	178,0	131,0	2,96	2,18	0,73
29. 9.	12	3	27,5°	89,3	69,5	2,47	1,93	0,78
1. 10.	12	5,5	28,6°	160,5	146,2	2,43	2,21	0,90
2. 10.	12	3	26,4°	82,0	57,2	2,28	1,69	0,69
3. 10.	12	5	26,0°	125,0	93,0	2,08	1,55	0,74

Bei diesem Versuche ist indes daran zu erinnern, dass das junge Tier während des Versuches in lebhafter Bewegung war, der Embryo sich dagegen sehr ruhig verhielt. Der Stoffwechsel der jungen Kobra wird deshalb offenbar verhältnismässig zu gross werden. Im allgemeinen ist es anzunehmen, dass die Sauerstoffaufnahme und die Kohlensäureproduktion des Kobraembryos in dem Endstadium der Bebrütung fast von derselben Grösse sind wie die für das junge Tier gefundene. Die Umsätze im hochentwickelten Embryo müssen also als denjenigen analog aufgefasst werden, welche wir am jungen Organismus kennen.



Es folgt nun der Übersichtlichkeit halber eine graphische Darstellung, bei welcher der Gasumsatz des Kobraembryos und des jungen Tieres bei verschiedenen Entwicklungsstadien kurvenmässig eingetragen ist. (Abb. 1.)

Der Wert des respiratorischen Quotienten des sich entwickelnden Eies führt zu der Annahme, dass der respiratorische Stoffwechsel während der Bebrütung des Kobraeies jedenfalls das Ergebnis einer Fettverbrennung ist.

Diesbezügliche Untersuchungen an bebrüteten Eiern der Meerschildkröte hat der eine der Verfasser (Tanaka) im vorigen Sommer an der Fukiage-Küste in der Präfektur Kagoshima begonnen. Wegen seines plötzlichen Todes am 14. August vorigen Jahres musste die Untersuchung unterbrochen werden, die von uns weiter fortgesetzt wird.

Für die grosse Freundlichkeit bei dieser Untersuchung sprechen wir Herrn Prof. Dr. K. Sugimoto und Herrn Dr. Fujimoto in dem staatlichen Institut für Volksernährung unseren ergebensten Dank aus.

LITERATUR.

- Bohr u. Hasselbalch (1900): Skand. Arch. **10**, 149.
Hasselbalch (1900): Skand. Arch. **10**, 353.
Bohr (1904): Skand. Arch. **15**, 23.
Fujimoto, K. (1935): Untersuchungsmethode des Gaswechsels.
Fukuda, S. (1939): JI. of Biochem. **30**, 125.
Karashima, J. (1929): JI. of Biochem. **10**, 375.

VERWIRKLICHUNG DER PHYTOCHEMISCHEN REDUKTION VON TRIMETHYLAMINOXYD.

VON

MASAJI TOMITA UND TOSIO TANAKA.

(Aus dem *physiologisch-chemischen Institut der
Universität zu Taihoku.*)

(Eingegangen am 8. Oktober 1942)

Während mit Hefe zahlreiche phytochemische Reduktionen der Carbonylgruppe von Aldehyden und Ketonen von Neuberg und seinen Schülern (1914–1936) durchgeführt sind, liegen nur wenige Untersuchungen über analoge Vorgänge der N-haltigen Verbindungen vor.

Unter den biogenen Aminen sind Trimethylaminderivate wegen ihrer Beziehungen zu Aminosäuren und quaternären Ammoniumbasen vom besonderen Interesse. Wir haben geprüft, ob auch das Trimethylaminoxid von Hefen reduziert werden kann, welches sich nach Suwa (1909) im Muskelextrakt des Dornhais, nach Henze (1914) im Cephalopodenmuskel und nach Hoppe-Seyler in Krebsmuskeln (1934) findet. Einer der Verfasser (Tomita) hat diesbezügliche Untersuchungen vor 20 Jahren in Berlin-Dahlem begonnen und wir haben dieselben hier in Taihoku fortgesetzt. Es wurde festgestellt, dass das Trimethylamin bei der phytochemischen Reduktion des Trimethylaminoxids entstand.

Wurde den Ansätzen aus Glukose, Wasser und Hefe, sobald die Gärung voll im Gange war, eine wässrige Lösung von Trimethylaminoxid zugefügt, so blieb die CO₂-Entwicklung ungestört. Das von uns verwendete Trimethylaminoxid war in folgender Weise bereitet: 100 ccm 33 proz. wässriger Trimethylaminlösung werden mit 600 ccm 3 proz. H₂O₂ versetzt. Ist nach 24 Stunden der Trimethylamingeruch noch nicht verschwunden, so setzt man nochmals 100–200 ccm H₂O₂ hinzu. Wenn kein Trimethylamin mehr nachweisbar ist, wird die Lösung im Vacuum

eingedampft und der Rückstand aus Alkohol-Äther umkrystallisiert. Das Hydrat des Oxyds, $(\text{CH}_3)_3\text{NO} + 2\text{H}_2\text{O}$, krystallisiert in herrlichen Nadeln vom Schmp. 96° .

VERSUCH 1.

50 g Traubenzucker, 500 ccm Leitungswasser, 50 g obergärige Sinner-Hefe, 5 g Trimethylaminoxid-hydrat.

Die Hefe wurde gut in der Glukoselösung verteilt. Sobald bei Zimmertemperatur die Gärung lebhaft geworden war, liessen wir das Trimethylaminoxid-hydrat in ca. 10 proz. wässriger Lösung allmählich eintropfen. Das Gärgemisch wurde dann im Brutschwank stehen gelassen.

Nach 48 stündigem Verweilen im Brutschrank wurde das Gärgemisch filtriert, dem Filtrat Salzsäure zugesetzt, bis das Kongorotpapier blau geworden ist, und zu Sirup im Vacuum bei 40° eingeeengt. Nach Zugabe von 150 ccm Alkohol wurde das ganze gut durchgeschüttelt und filtriert. Das Filtrat wurde wieder im Vacuum konzentriert und nochmals genau so behandelt. Nach Einengung des neuen Filtrats wurde mit 150 ccm absolutem Alkohol versetzt und filtriert. Das eingeeengte Filtrat wurde nochmals mit absolutem Alkohol in derselben Weise versetzt. Das neue Filtrat wurde von Alkohol befreit, der Rückstand in 5 ccm Wasser aufgenommen und mit 10 ccm 10 proz. alkoholischer Platinchloridlösung versetzt. Beim Anreiben und Abkühlen schieden sich Krystalle aus. Die Krystalle wurden abgesaugt, mit kaltem Alkohol gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Durch Umkrystallisieren aus heissem Wasser erhielt man aus 1,5 g Rohprodukt 0,4 g Platinsalz vom Schmelzpunkt 222° .

0,1634 g Substanz gaben 0,0606 g Pt = 37,08%

Ber. für $(\text{C}_3\text{H}_9\text{N} \cdot \text{HCl})_2\text{PtCl}_4$: Pt 36,95%

Gef: 37,08%.

Aus der Mutterlauge schieden sich noch 0,6 g Platinsalz, die bei 244° schmolzen. Die Analysendaten zeigen, dass es sich um unverändertes Trimethylaminoxid handelt.

0,0908 g Substanz gaben 0,0316 g Pt = 34,80%

Ber. für $(C_3H_7NO \cdot HCl)_2PtCl_4$: Pt 34,84%

Gef: 34,80%.

Die Angaben über den Schmelzpunkt der Platinsalze von Trimethylamin und Trimethylaminoxyd gehen stark auseinander. Ehrenberg (1887) gab an, dass das Trimethylaminplatinat bei 240–245° schmilzt, nach Ackermann (1910) jedoch schon bei 190°. Durch wiederholte Untersuchungen haben wir konstatiert, dass mehrfach umkrystallisiertes Platinsalz des Trimethylamins bei 222° schmilzt. Nach Suwa (1909) liegt der Schmelzpunkt des Trimethylaminoxyd-platinats bei 214°, nach Henze (1914) jedoch bei 245°. Durch unsere Untersuchungen wurde die Richtigkeit der Henze'schen Angabe bestätigt.

Als Kontrollversuch wurden 50 g Hefe in 500 ccm Leitungswasser verteilt, 15 Minuten lang gekocht und dann 5 g Trimethylaminoxydhydrat in wässriger Lösung zugesetzt und im Brutschrank aufbewahrt. Nach 48 Stunden wurde die Lösung abfiltriert und genau so wie beim Gärgemisch bearbeitet. Man bekam dabei 0,35 g Platinsalz, welches bei 244° schmilzt. Dass es sich um Trimethylaminoxyd-platinat handelte, wurde durch folgende Bestimmung bestätigt.

0,1772 g Substanz gaben 0,0600 g Pt = 34,44%

Ber. für $(C_3H_7NO \cdot HCl)_2PtCl_4$: Pt 34,84%

Gef: 34,44%.

VERSUCH 2.

Die Anordnung dieses Versuches wich von der des vorhergehenden ab, indem untergärrige Hefe angewendet wurde; auch wurde im Kontrollversuch 50 g Glukose zugesetzt. Die Ansätze blieben dann 4 Tage bei 37° stehen.

Die Aufarbeitung geschah in der gleichen Weise wie beim Versuch 1.

Vor dem Zusatz von alkoholischer Platinchloridlösung wurde der Alkoholextrakt stark eingengt und im Eisschrank aufbewahrt. Daraus schieden sich 2 g Trimethylaminoxyd-chlorhydrat aus, die bei 217° schmolzen.

Nach dem Absaugen des Trimethylaminoxyd-chlorhydrats wurde das Filtrat mit 10%iger alkoholischer Platinchloridlösung gefällt. Durch wiederholtes Umkrystallisieren erhielt man 0,25 g Platinsalz, das bei 221–222° schmolz.

0,1032 g Substanz gaben 0,0381 g Pt=36,91%	
Ber. für $(C_3H_5N \cdot HCl)_2PtCl_4$:	Pt 36,95%
Gef.:	36,91%.

Somit war ein Teil des zugesetzten Trimethylaminoxys durch phytochemische Reduktion in Trimethylamin verwandelt.

Aus dem Kontrollversuche wurden 0,24 g Platinat erhalten, die bei 243–244° schmolzen. Durch folgende Analyse ist zweifellos bewiesen, dass man es bei dem erhaltenen Salz mit dem Platinat des unverändert ausgeschiedenen Trimethylaminoxys zu tun hat.

0,1250 g Substanz gaben 0,0434 g Pt=34,72%	
Ber. für $(C_3H_5NO \cdot HCl)_2PtCl_4$:	Pt 34,84%
Gef.:	34,72%.

Bei dieser Gelegenheit sei mitgeteilt, dass inzwischen auch die phytochemische Reduktion des Kairilinoxys mit Hefe ausgeführt ist. Hierüber soll später berichtet werden.

LITERATUR.

- Ackermann u. Schütze (1910): *Centralbl. f. Physiol.* **24**, 210.
 Ehrenberg (1887): *Zs. f. physiol. Chem.* **11**, 253.
 Henze (1914): *Zs. f. physiol. Chem.* **91**, 230.
 Hoppe-Seyler (1934): *H-S.* **221**, 45.
 Neuberg u.a. (1914): *Bioch. Zs.* **59**, 188; **62**, 477 u. 492; **67**, 22.
 Neuberg u.a. (1915): *Bioch. Zs.* **71**, 114.
 Neuberg u.a. (1918): *Bioch. Zs.* **91**, 257.
 Neuberg u.a. (1919): *Ber. d. Deutsch. Chem. Ges.* **52**, 2237 u. 2248.
 Neuberg u.a. (1920): *Bioch. Zs.* **112**, 313.
 Neuberg u.a. (1927): *Bioch. Zs.* **182**, 482; **190**, 226.
 Neuberg u.a. (1935): *Bioch. Zs.* **279**, 140.
 Ochiai u. Miyake (1935): *Bioch. Zs.* **282**, 293.
 Vercellone (1935): *Bioch. Zs.* **279**, 137.

ÜBER DIE IM TIERKÖRPER STATTFINDENDEN VERÄNDERUNGEN DER AN N SUBSTITUIERTEN AMINOSÄUREN.

8. Mitteilung:* Über die Demethylase II. Ihre Verteilung.

VON

TATUO YOSIDA UND SENDEN FUKUYAMA.

(Aus dem Med.-Chem. Laboratorium der Medizinischen Schule,
angegliedert an die Kaiserliche Universität zu Taihoku.

Vorstand: Prof. Dr. R. Hirohata.)

(Eingegangen am 14. November 1942)

Wie scho nerwähnt, haben Hirohata *et al.* (1936–1938) festgestellt, dass Kaninchen, denen grössere Mengen von Abrin parenteral einverleibt werden, interessanterweise neben kleinen Mengen des Ausgangsmaterials relativ grosse Mengen von Kynurensäure und Kynurenin ausscheiden. Die Menge der nach Abrinverabreichung ausgeschiedenen Kynurensäure ist bei Kaninchen so gross, dass das Abrin unter allen Tryptophanderivaten als Kynurensäurebildner die erste Stelle nach dem Tryptophan einnimmt. Ebenso steht es als Kynureninbildner unmittelbar nach dem Tryptophan.

Inzwischen haben Chin Kyu-sui (1938) nachgewiesen, dass das Abrin dem Tryptophan in bezug auf die hämatopoetische Wirkung bei Kaninchen in keiner Weise unterlegen ist, wensschon sein wachstumsfördernder Einfluss bei Ratten ein wenig geringer ist.

Schon Gordon und Jackson (1935) haben gefunden, dass das synthetische α -N-Methyltryptophan schwächer als Tryptophan auf die Wachstumsförderung von Ratten wirkte, was sie damit erklärten, dass die *d*-Form im Tierkörper nicht ausgenützt werden kann.

* 7. Mitteilung: T. Yosida und S. Fukuyama, Dieses Journal, **34**, 429, 1941.

Andererseits hat Keisou Rin(1940) gezeigt, dass die hämatopoetische Wirkung des Abrins bei Ratten etwas verzögert ist gegen die bei den Kaninchen, und daraus geschlossen, dass das Verhalten des Abrins im Tierkörper je nach der Tierart verschieden ist. Er hat ausserdem die Heilwirkung des Abrins auf Anchylostomiasisanämie des Menschen nachgewiesen.

Tai-sei To (1939) hat gefunden, dass das in den Kaninchenorganismus eingeführte *dl*-O-N-Dimethyltyrosin, dort zum grössten Teil asymmetrisch abgebaut, und zwar die *l*-Säure nach Umwandlung in *p*-Methoxyphenylbrenztraubensäure, die *d*-Säure ohne weitere Veränderung mit dem Harn ausgeschieden wird, aber dagegen den Hundeorganismus ohne irgendwelche besondere Veränderungen zu erleiden passiert, namentlich ohne dass Desaminierung in nennenswertem Umfang eintritt.

Die letzten Arbeiten von Yosida und Fukuyama (1941) erbrachten den Nachweis, dass die Demethylierung des Abrins *in vitro* bei Anwesenheit von Kaninchen-Nierenbrei und -Leberbrei vor sich geht und zwar durch das in beiden Organen enthaltene Ferment: Demethylase, so dass der Abbau der N-Methylaminosäure im Tierorganismus als dessen ersten Schritt eine Entmethylierung durch Demethylase fordert.

Durch diese Arbeiten angeregt, haben wir uns die Frage vorgelegt, ob die Demethylase in anderen Tierorganismen vorkommt und ob die angegebene Differenz im Verhalten der Methylaminosäure in den verschiedenen Tierorganismen quantitativer Natur (z. B. eine Differenz im Gehalt an Demethylase) oder qualitativer Natur sei.

Wie schon in der 7. Mitteilung (Yosida und Fukuyama 1941) hervorgehoben wurde, wurde die Demethylierung bei Kaninchen nur in der Niere und Leber beobachtet, aber es ist auch an und für sich interessant zu prüfen, an welchem Ort von anderen Tierarten die Demethylierung vollzogen wird.

Diese Frage veranlasste eine Reihe von Bestimmungen der Demethylase in verschiedenen Organen verschiedener Tierarten, deren Resultate in vorliegender Arbeit mitgeteilt werden.

Die Untersuchung der einzelnen Organe auf Demethylase

geschah durch Messung ihrer Sauerstoffatmung bei Anwesenheit von *l*-Abrin, da die Demethylierung in der Aufnahme von 1/2 Molekel Sauerstoff pro Molekel *l*-Abrin und der Bildung von je einer Molekel Tryptophan und Formaldehyd besteht.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

(I) *Methoden.*

Die Organe der Tiere wurden nach dem Schlachten sofort herausgenommen und sogleich im Porzellanmörser mit 3 facher Phosphatpufferlösung (pH 7,1) zerrieben. Die Organbreie wurden sofort mit *l*-Abrin manometrisch ausgetestet, da wir die Beobachtung machten, dass die Wirksamkeit des Organbreis mit der Zeit abnimmt. Die Messung der Sauerstoffatmung geschieht mit dem Warburg-Manometer.

- a) Im Hauptraum: 0,5 ccm Organbrei und 2,5 ccm *m*/15-Phosphatpuffer (pH 7,1)
- b) Im Anhang: 2,18 mg *l*-Abrin in 0,5 ccm *m*/15 (Phosphatpuffer (pH 7,1))
- c) Im Einsatz: 0,5 ccm *n*-Natronlauge
- d) Im Gasraum: Luft
- e) Temperatur des Thermostaten: 38°C
- f) Versuchsdauer: 90 Minuten

(II) *Masseinheiten.*

Als Mass für die Sauerstoffatmung der einzelnen Organe brauchten wir den Quotienten:

$$Q_{O_2} = \frac{\text{Kubikmillimeter verbrauchtes } O_2}{\text{Milligramm Organ (trocken)} \times \text{Stunden}}$$

(III) *Resultat.*

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Bei der Mehrzahl der untersuchten Tiere konnten wir in Niere und Leber einen Gehalt an Demethylase, jedoch in von Tier zu Tier verschiedenem Werte, feststellen, aber in anderen Organen nicht. Kaninchen und Meerschweinchen besitzen den höchsten Gehalt an Ferment, Ratte, Schwein und Hund hingegen den kleinsten.

Organ Tier	Differenz von Q_{O_2} des Organbreis mit gegen ohne <i>l</i> -Abrin							
	Niere	Leber	Milz	Lunge	Muskel	Darm	Blut	Gehirn
Kaninchen	1,42	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Meerschweinchen	1,15	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Taube	0,80	0,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Huhn	0,51	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Frosch	0,44	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Rind	0,39	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Büffel	0,28	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Hausente	0,19	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Katze	0,03	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Schwein	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ratte	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Hund	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mensch	0,02	—	—	—	—	—	—	—

Im Gegensatz zu *d*-Aminosäureoxydase, von der nach Birkhofer und Wetzel (1941) die Carnivoren den höchsten Gehalt besitzen und die Herbivoren hingegen den niedrigsten, ist es sehr bemerkenswert, dass die Herbivoren und Vögel einen höheren Gehalt an Demethylase besitzen als die Carnivoren.

Die frische Menschenniere zeigt auch Demethylasewirkung. Gesundes Gewebe einer tuberculösen Niere hat Herr a.o. Prof. Akima von der hiesigen Hautklinik dankenswerterweise zu Verfügung gestellt.

SCHLUSSFOLGERUNGEN.

1. Die Demethylase ist in der Tierwelt weit verbreitet, d. h. findet sich in den Organismen von Kaninchen, Meerschweinchen, Taube, Huhn, Frosch, Rind, Büffel, Hausente, Katze, Schwein, Ratte und Hund. Obwohl die Demethylase in der Gegenwart für den tierischen Stoffwechsel keine Bedeutung zu haben scheint, liegt doch der Nachweis ihrer weiten Verbreitung in der Tierwelt, was in vorliegender Arbeit erfolgreich versucht wurde, im biologischen

Interesse.

2. Die Demethylase wird nur in Niere und Leber nachgewiesen, aber nicht in anderen Organen, woraus folgt, dass die beiden Organe die Hauptorte der Demethylierung der N-Methylaminosäure im Tierorganismus sind.

3. Der Gehalt an Demethylase wechselt in seinem Wert von Tier zu Tier, jedoch besitzen Kaninchen den höchsten Gehalt, woraus geschlossen wird, dass die schon angegebene Differenz im Verhalten der Methylaminosäuren im Tierorganismus zum Teil durch wechselnden Gehalt an Demethylase begründet sei.

4. Die Menschenniere zeigt auch Demethylasewirkung.

LITERATUR.

Chin, Kyu-sui (1938): Z. physiol. Chem., **257**, 12.

Gordon, W. G. und Jackson, R. W. (1935): J. of Biol. Chem., **110**, 151.

Hirohata, R. et al. (1936-1938): Verhandlungen d. Jap. Bioch. Ges., **11**, 217; **12**, 182.

Rin, Kei-sou (1940): Mitt. med. Ges. Taiwan, **39**, 1947.

To, Tai-sei (1939): Z. physiol. Chem., **260**, 175.

Yosida, T. und Fukuyama, S. (1941): Dieses Journal, **34**, 429.

ÜBER DIE IM TIERKÖRPER STATTFINDENDEN VERÄNDERUNGEN DER AN N SUBSTITUIERTEN AMINOSÄUREN.

9. Mitteilung:* Über die Demethylase III. Ihre Eigenschaften und Komponenten.

VON

TATUO YOSIDA.

(Aus dem Med.-Chem. Laboratorium der Medizinischen Schule,
angegliedert an die Kaiserliche Universität zu Taihoku.
Vorstand: Prof. Dr. R. Hirohata.)

(Eingegangen am 14. November 1942)

In der 7ten Mitteilung (Yosida und Fukuyama, 1941) dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Niere und Leber von Kaninchen ein Ferment enthalten, welches das Abrin unter Aufnahme von $1/2$ Molekel Sauerstoff in Tryptophan und Formaldehyd zu spalten imstande ist. Das oxydative Ferment wurde „Demethylase“ genannt.

In vorliegender Arbeit werden die Eigenschaften der Demethylase eingehender geprüft und es wird gefunden, dass das Ferment ein konjugiertes Protein ist; und sich in einen unwirksamen Proteinteil und einen reversibel wiederum unwirksamen Nichtproteinteil trennen lässt. Der letztere wird höchstwahrscheinlich als Alloxazin-adenindinukleotid identifiziert.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

(I) *Reinigung der Demethylase.*

1. Schritt: Nieren von Kaninchen wurden nach dem Schlachten sofort herausgenommen und sogleich im Mörser zerkleinert und in die fünffache Menge Aceton gegeben. Die Nierensubstanz abgesaugt, mit Aceton gewaschen und im Vakuum-Exsikkator über

* 8. Mitteilung: T. Yosida und S. Fukuyama, Dieses Journal,

Adsole getrocknet. Die trockene Nierensubstanz lässt sich über 6 Monate in Exsikkator bei 0° ohne Abnahme der Wirksamkeit aufbewahren.

2 g der Nierensubstanz werden mit 40 ccm 0,9% NaCl-Lösung 30 Minuten bei 38°C extrahiert und zentrifugiert. Die überstehende Lösung (F_1) enthält das Ferment und etwa 9,76 mg Protein pro ccm. Sie gibt im manometrischen Test mit *l*-Abrin z. B. folgende Ausschläge und zeigt 10,5 als Q_{O_2} (Tabelle I).

TABELLE I.

Gasraum: Sauerstoff, Puffer: Pyrophosphat, pH: 7,1,
Einsatz: NaOH, Temperatur: 38°C.

	2,18 mg <i>l</i> -Abrin* 0,5 ccm Flüssigkeit F_1 3 ccm Pufferlösung	— 0,5 ccm Flüssigkeit F_1 3 ccm Pufferlösung
ccm O_2 in 60 Minuten	54	3

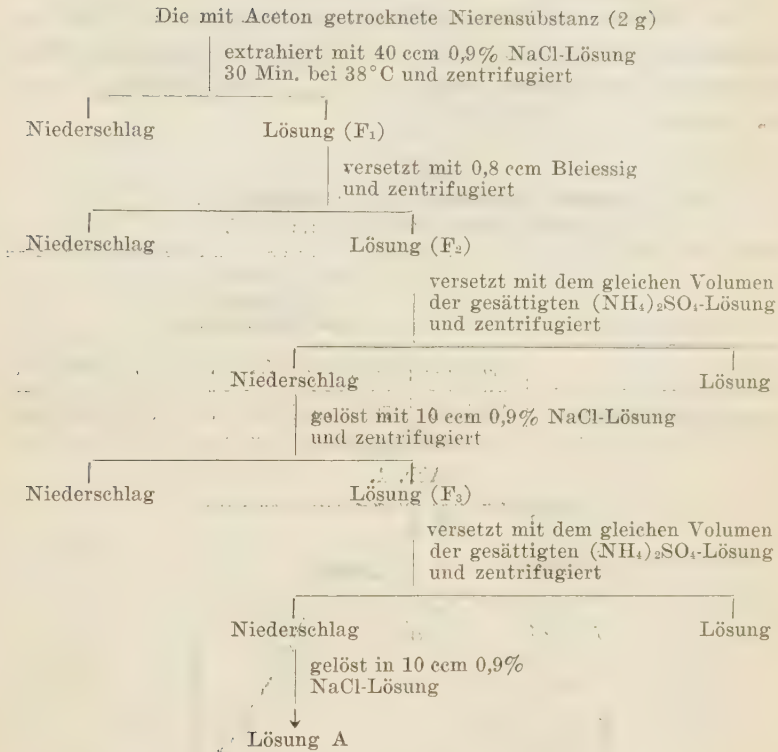
* 2,18 mg *l*-Abrin verbraucht theoretisch 112 ccm Sauerstoff.

2. Schritt: 40 ccm der Fermentlösung (F_1) werden mit 0,8 ccm Bleiessig versetzt. Der entstandene Niederschlag wird abzentrifugiert und verworfen. Aus der überstehenden Lösung (F_2), die das Ferment enthält, wird das Ferment mit dem gleichen Volumen einer mit sekundärem Natriumphosphat auf pH 6,8 gepufferten, gesättigten Ammoniumsulfatlösung niedergeschlagen. Man zentrifugiert, giesst die überstehende Flüssigkeit ab und verwirft sie. Den Niederschlag löst man mit 10 ccm 0,9% NaCl-Lösung und der ungelöste Teil wird abzentrifugiert und verworfen.

3. Schritt: Die überstehende Flüssigkeit (F_3) wird noch einmal mit dem gleichen Volumen der gesättigten auf pH 6,8 gepufferten Ammoniumsulfatlösung versetzt. Der dabei entstandene Niederschlag wird abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen und verworfen.

4. Schritt: Der Niederschlag wird in 10 ccm 0,9% NaCl-Lösung gelöst (Lösung A), wobei kein Niederschlag bleibt (Tabelle II).

TABELLE II.

Reinigung der Demethylase.

Lösung A ist gelbbraun, enthält pro ccm 1,67 mg Protein, gibt im manometrischen Test mit *l*-Abrin z. B. folgende Ausschläge und zeigt 96,1 als Q_{02} (Tabelle III).

TABELLE III.

Gasraum: Sauerstoff, Puffer: Pyrophosphat, pH: 7,1,
Einsatz: NaOH, Temperatur: 38°C.

	2,18 mg <i>l</i> -Abrin 0,5 ccm Lösung A 3 ccm Pufferlösung	0,5 ccm Lösung A 3 ccm Pufferlösung
ccm O ₂ in 60 Minuten	81	0

(II) *Eigenschaften der Demethylase.*(1) P_H -Kurve.

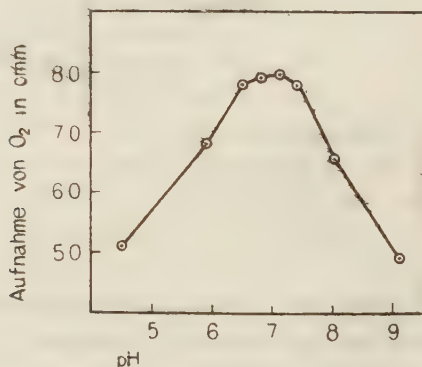
Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration des Reaktionsmediums auf die Spaltung des Abrins durch Demethylase wurde untersucht. P_H -Optimum liegt bei P_H 7,1 wie Tabelle IV und Fig. 1 zeigen.

TABELLE IV.

Gasraum: Sauerstoff, Puffer: Pyrophosphat,
Einsatz: NaOH, Temperatur: 38°C.

	2,18 mg <i>l</i> -Abrin 0,5 ccm Lösung A 3 ccm Pufferlösung								
pH	4,5	5,9	6,5	6,8	7,1	7,4	7,7	8,0	9,1
emm O ₂ in 60 Minuten	51	68	78	79	80	78	72	66	49

Abb. 1.



(2) Der Einfluss der verschiedenen Puffer.

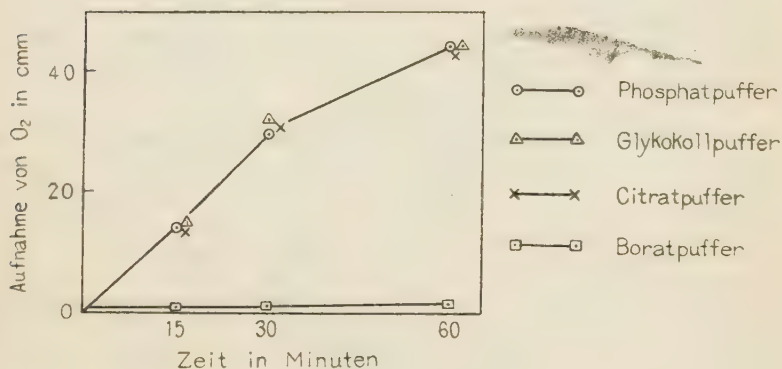
Die Wirkung der Demethylase in Gegenwart von je Phosphat-, Citrat-, Glykokoll- oder Borat-Puffer wurde bei P_H 7,1 geprüft. Im Boratpuffer, welcher aus Kahlbaum's Präparat (zu Enzymstudien nach Sörensen) dargestellt wurde, konnte man keine Fermentwirkung beobachten, dagegen erwiesen sich Citrat- und Glykokoll-Puffer gleich geeignet wie Phosphatpuffer (Tabelle V und Fig. 2).

TABELLE V.

Gasraum: Sauerstoff, Puffer: *m/15* verschiedene Puffer,
Einsatz: NaOH, Temperatur: 38°C.

Art des Puffers	2,18 mg <i>l</i> -Abrin 0,25 ccm Lösung A 3,25 ccm Pufferlösung			
	Phosphat- puffer	Glykokoll- puffer	Citrat- puffer	Borat- puffer
emm O ₂ in 15 Min.	14	14	14	0
" 30 "	30	27	26	0
" 60 "	44	44	43	0

Abb. 2.



(3) Einfluss der Substratkonzentration.

Die Sauerstoffmengen, die durch eine bestimmte Menge der Fermentlösung in gleichen Zeiten verbraucht werden, sind von der Menge des dargebotenen Abrins nahezu unabhängig. Am Ende der Reaktion erreicht der Sauerstoffverbrauch fast den theoretischen Wert, d. h. 1/2 Sauerstoffmolekel pro eine Molekel Abrin (Tabelle VI und Fig. 3).

TABELLE VI.

Gasraum: Sauerstoff, Puffer: Pyrophosphat, pH: 7,1,
Einsatz: NaOH, Temperatur: 38°C.

	0,3 cem Lösung A: 3 cem Pufferlösung					
	I	II	III	IV	V	VI
Abrin in mg	0,27	0,55	1,09	2,18	4,36	8,72
emm O ₂ in 30 Min.	13	23	30	30	30	30
" 60 "	15	27	54	54	54	54
" 90 "	15	27	60	78	78	78
" 120 "	15	27	60	95	95	95
" 150 "	15	27	60	114	114	114
" 180 "	15	27	60	114	130	130
" 210 "	15	27	60	114	147	147
" 240 "	15	27	60	114	162	162
theoretische Menge von O ₂ in emm	14	28	56	112	224	448

Abb. 3.

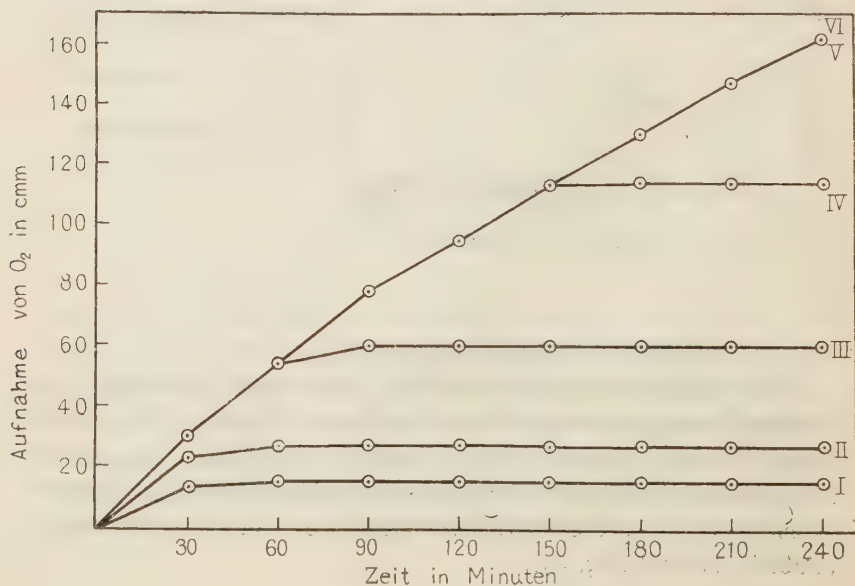


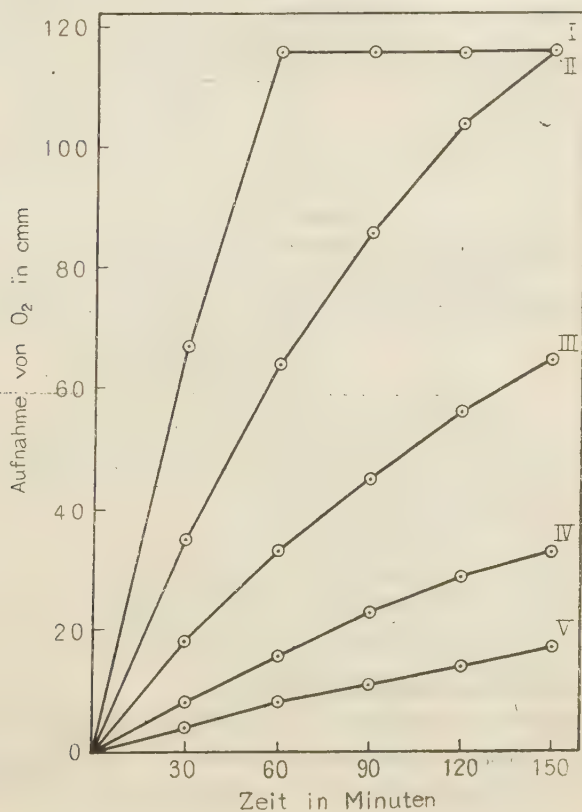
TABELLE VII.

Gasraum: Sauerstoff, Puffer: Pyrophosphat, pH: 7,1,

Einsatz: NaOH, Temperatur: 38°C.

	2,18 mg l-Abrin 3 cem Pufferlösung				
	I	II	III	IV	V
Lösung A in cem	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031
cemm O ₂ in 30 Min.	67	35	18	8	4
" 60 "	116	64	33	16	8
" 90 "	116	86	45	23	11
" 120 "	116	104	56	29	14
" 150 "	116	116	65	33	17

Abb. 4.



(4) Einfluss der Fermentmenge.

Fermentmenge und Reaktionsgeschwindigkeit sind bei P_H 7,1 einander im geprüften Bereiche etwa proportional (Tabelle VII und Fig. 4).

(5) Einfluss des Formaldehydes und Tryptophans.

Formaldehyd, der als ein Reaktionsprodukt entsteht, hemmt die Demethylasewirkung schon in einer geringen Menge, aber Tryptophan nicht (Tabelle VIII, IX und Fig. 5).

TABELLE VIII.

Gasraum: Sauerstoff, Puffer: Pyrophosphat, pH: 7,1,
Einsatz: NaOH, Temperatur: 38°C.

	2,18 mg l-Abrin 0,5 ccm Lösung A 3 ccm Pufferlösung 2,04 mg Tryptophan	2,18 mg l-Abrin 0,5 ccm Lösung A 3 ccm Pufferlösung —
cm O ₂ in 30 Minuten	67	67
" 60 "	116	116

TABELLE IX.

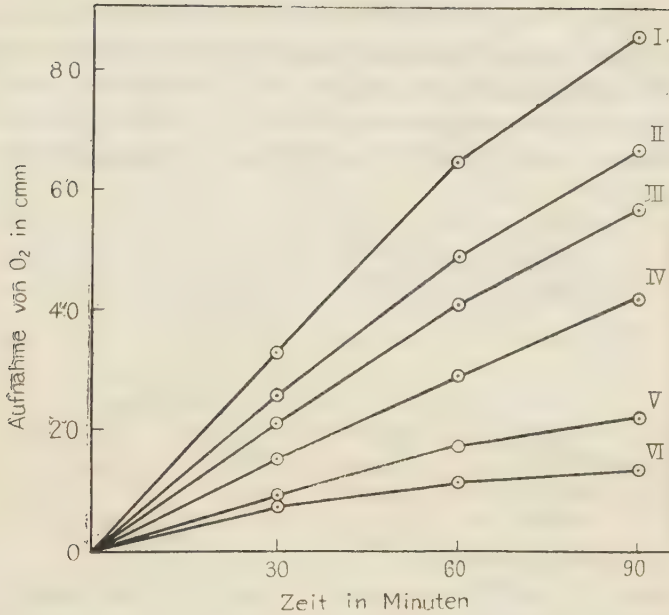
Gasraum: Sauerstoff, Puffer: Pyrophosphat, pH: 7,1,
Einsatz: NaOH, Temperatur: 38°C.

	2,18 mg l-Abrin 0,25 ccm Lösung A 3,25 ccm Pufferlösung					
	I	II	III	IV	V	VI
Formaldehyd in mg	—	0,09	0,21	0,52	1,25	2,50
cm O ₂ in 30 Minuten	33	26	21	15	9	7
" 60 "	65	49	41	29	17	11
" 90 "	86	67	57	42	22	13
% der Hemmung	—	16	36	56	72	82

(6) Einfluss anorganischer Salze.

FeCl₃, MnSO₄ und NaF sind in $m/200$ -Lösung noch fast wirkungslos. Dagegen hemmte Pb-acetat in $m/200$ -Lösung die Demethylasewirkung um etwa 30%, während es in $m/1000$ -Lösung

Abb. 5.



nicht mehr deutlich einwirkt. Quecksilber-, Kupfer- und Silbersalze hemmen sie auch in dieser Konzentration vollständig. Andererseits wurde beobachtet, dass CaCl_2 in $m/200$ -Lösung auf die Demethylase beschleunigend einwirken (Tabelle X).

TABELLE X.

Gasraum: Sauerstoff, pH: 7,1, Einsatz: NaOH, Temperatur: 38°C.

Konzentration der anorganischen Salze: $m/200$.

Art der Salze	2,18 mg l-Abrin 0,5 ccm Lösung A 3 ccm Pufferlösung								
	—	FeCl ₃	MnSO ₄	NaF	Pb-acetat	HgCl ₂	Ag-acetat	CuSO ₄	CaCl ₂
Art des Puffers	Phosphat	Citrat	Glykokoll	Glykokoll	Glykokoll	Citrat	Citrat	Citrat	Citrat
cmm O ₂ in 60 Min.	110	113	115	111	77	0	0	0	127
% der Hemmung und Aktivierung	—	—	—	—	-30	-100	-100	-100	+15

(7) Einfluss von KCN.

Bei Zusatz von $m/200$ KCN auf ein Ferment-Substrat-System wurde ebenso wie bei Einwirkung einer Fermentlösung, die vorher mit KCN-Lösung zusammen gelassen war, auf das Substrat eine Hemmung der Demethylasewirkung nicht beobachtet, so dass die Demethylase gegen Cyan in $m/200$ -Lösung unempfindlich ist (Tabelle XI).

TABELLE XI.

Gasraum: Sauerstoff, Puffer: Pyrophosphat, pH: 7,1,
Einsatz: NaOH, Temperatur: 38°C.

	2,18 mg <i>l</i> -Abrin 0,5 ccm Lösung A 3 ccm Pufferlösung		
Zusatz der $m/200$ KCN	—	+(allein)	+(mit Substrat)
ccm O ₂ in 60 Minuten	116	118	114

(8) Thunberg-Versuch.

Tabelle XII zeigt, dass *l*-Abrin in Gegenwart von Demethylase Methylenblau reduziert.

TABELLE XII.

Substrat: 2,18 mg *l*-Abrin, Ferment: Lösung A 0,5 ccm,
Temperatur: 38°C, Puffer: Pyrophosphat, pH: 7,1,
Jeder Ansatz enthält 0,5 ccm $m/5000$ Methylenblau.

	2,18 mg <i>l</i> -Abrin 0,5 ccm Lösung A 0,5 ccm Methylenblau 3 ccm Pufferlösung	— 0,5 ccm Lösung A 0,5 ccm Methylenblau 3 ccm Pufferlösung
Entfärbungszeit in Minuten	30	>60

(III) Die reversible Spaltung der Demethylase:

Dialysiert man die Lösung A in Cellophanschläuchen bei 0° gegen eine grosse Menge Wasser 72 Stunden, so entfärbt sich die Innenflüssigkeit und es entsteht eine Trübung aus der denaturierten Eiweisskomponente. Man nimmt die Lösung heraus und zentrifugiert sie. Die überstehende klare, farblose Lösung (Lösung B)

ist als Demethylase unwirksam. Andererseits erhitzt man die Lösung A 15 Minuten auf 80°C und zentrifugiert, so ist die überstehende Lösung (Lösung C) als Demethylase ebenfalls unwirksam.

Wenn man nun die Lösung B und die Lösung C' zusammengibt kehrt die Wirksamkeit zu ca. 30% zurück, aber nicht zu 100%, da dem Anschein nach während der Dialyse ein Teil der Eiweisskomponente denaturiert wird (Tabelle XIII).

Durch diesen Versuch war bewiesen, dass die Demethylase ein reversibles konjugiertes Protein ist, und die prosthetische Gruppe durch Erhitzung (15 Minuten auf 80°C) abgespalten werden kann.

TABELLE XIII.

Gasraum: Sauerstoff, Puffer: Pyrophosphat, pH: 7,1,

Einsatz: NaOH, Temperatur: 38°C.

		I	II	III	IV
Hauptraum	Lösung A	0,5 cem	—	—	—
	Lösung B	—	0,5 cem	—	0,5 cem
	Lösung C	—	—	0,5 cem	0,5 cem
	Pufferlösung	2,5 cem	2,5 cem	2,5 cem	2,5 cem
Birne	l-Abrin in 0,5 cem Pufferlösung	2,18 mg	2,18 mg	2,18 mg	2,18 mg
emm O ₂ vor Einkippen des Abrins in 10 Minuten		0	0	0	0
emm O ₂ nach Einkippen des Abrins in 60 Minuten		110	0	0	33

(IV) Alanintest.

Der Proteinteil (Lösung D) der *d*-Aminosäureoxydase, der aus Schweineniere nach Negelein und Brömel(1939) gewonnen wird, füllt man in den Hauptraum eines Manometergefäßes ein. Der Einsatz enthält Natronlauge, der Gasraum reinen Sauerstoff, die Ansatzbirne 0,5 cem einer 0,7% igen Lösung von *dl*-Alanin.

Ohne Zusatz prosthetischer Gruppe ist der Test reaktionslos.

Nach Zusatz von Alloxazin-adenin-dinukleotid*, das aus Bäckerhefe nach Warburg und Christian (1938) dargestellt wurde in den Hauptraum, tritt ein Sauerstoffverbrauch auf.

Wenn man nun der Lösung C, die 15 Minuten auf 80°C erhitzte Demethylase-Lösung, anstatt des Alloxazin-adenin-dinukleotides im Hauptraum zusetzt, wird auch ein Sauerstoffverbrauch beobachtet (Tabelle XIV).

TABELLE XIV.

Gasraum: Sauerstoff, Puffer: Pyrophosphat, pH: 7,1,
Einsatz: NaOH, Temperatur: 38°C.

		I	II	III
Hauptraum	Lösung D	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm
	Alloxazin-adenin-dinukleotid	—	50γ	—
	Lösung C	—	—	0,5 ccm
	Pufferlösung	2,5 ccm	2,5 ccm	2,5 ccm
Birne	0,7%iges dl-Alanin	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm
emm O ₂ vor Einkippen des Alanins in 10 Minuten		0	0	0
emm O ₂ nach Einkippen des Alanins in 60 Minuten		0	120	65

Nach diesem Test wird vermutet, dass die prosthetische Gruppe der Demethylase Alloxazin-adenin-dinukleotid sei.

(V) Die Rekonstruktion von Demethylase.

Wie schon erwähnt, ist die Lösung B, der Proteinteil der Demethylase, für sich unwirksam.

Wenn man nun die Lösung B und Alloxazin-adenin-dinukleotid zusammengibt, rekonstruiert sich die Demethylase. Dies geht aus dem folgenden Versuch hervor. Beim Zusatz von Alloxazin-

* Herren Prof. Masayama und Dr. Suda in Osaka, die das Alloxazin-adenin-dinukleotid zur Verfügung gestellt haben, spreche ich auch hier meinen besten Dank aus.

adenindinukleotid erfolgt Sauerstoffaufnahme in gleichem Grad wie bei der Zusammengebung der Lösung B mit der Lösung C (Tabelle XV).

TABELLE XV.

Gasraum: Sauerstoff, Puffer: Pyrophosphat, pH: 7,1,
Einsatz: NaOH, Temperatur: 38° C.

		I	II	III	IV
Hauptraum	Lösung A	0,5 ccm	—	—	—
	Lösung B	—	0,5 ccm	—	0,5 ccm
	Alloxazin-adenin- dinukleotid	—	—	50γ	50γ
	Pufferlösung	2,5 ccm	2,5 ccm	2,5 ccm	2,5 ccm
Birne	l-Abrin in 0,5 ccm Pufferlösung	2,18 mg	2,18 mg	2,18 mg	2,18 mg
cmm O ₂ vor Einkippen des Abrins in 10 Minuten		0	0	0	0
cmm O ₂ nach Einkippen des Abrins in 60 Minuten		110	0	0	29

SCHLUSSFOLGERUNGEN

1. Die Reinigung der Demethylase von Kaninchenniere wird beschrieben.

2. Die Eigenschaften der Demethylase werden eingehender geprüft.

3. Die Demethylase ist ein reversibles konjugiertes Protein, das aus einem Proteinteil und einer prosthetischen Gruppe besteht, die sich dissozzierend zu dem wirksamen Ferment verbinden.

4. Es wird höchstwahrscheinlich gemacht, dass die prosthetische Gruppe der Demethylase Alloxazin-adenin-dinukleotid ist.

LITERATUR.

- Negelein, E. und Brömel, H. (1939): Biochem. Z., **300**, 225.
 Warburg, O. und Christian, W. (1938): Biochem. Z., **298**, 150.
 Yosida, T. und Fukuyama, S. (1941): Dieses Journal, **34**, 429.

ÜBER DIE ZUCKERBILDER DER HAUT BEI NORMALEM UND PATHOLOGISCHEM STOFFWECHSEL.

VON

KEISHI SHINKAI.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Praefektur-Hospitals
zu Kobe. Leiter: Dr. M. Takeda.)

(Eingegangen am 16. November 1942)

I. Teil:

In der Literatur ist nicht so selten über die Bestimmungen des Zuckergehaltes der Haut geschrieben worden. So erfolgten z. B. über die Tierhaut von Autoren, wie Bang (1913), Palmer (1917), Folin (1927) und Urbach (1928) Veröffentlichungen. Bang und Folin haben ihre eigenen Bestimmungsthoden, Urbach jene von Hagedorn-Jensen angewendet. Bei uns in Japan haben wir die Veröffentlichungen über die Bestimmung des Zuckergehaltes bei Kaninchenhaut von Miyake, Narahara und Tukada (1930) herangezogen, in denen die Urbachsche Methode für die Messung des Hautzuckers benutzt wurde. Es wurde auch die von Urbach. Miyake und Narahara aufgezeichnete Kurve des Zuckergehaltes von Blut und Haut nach oraler Zuckerbelastung bei an verschiedenen Hautkrankheiten leidenden Patienten oder normalen Kaninchen verglichen. Bei Kaninchen wurde auch von Narahara beobachtet, welche Einflüsse die verschiedenen vegetativen Nervenstoffe, Ionen, Schwermetalle und das Insulin auf den Hautzuckergehalt ausüben. Folin hat die Verteilung und Wiederherstellung des Zuckers bei Organen und Geweben von Tieren nach der Zuckerlösungsinfusion vielfach untersucht. Damit meinte er, dass innerhalb 30 Minuten nach Zuckerinfusion 80% des injizierten Zuckers als freier Zucker im Blut, in den Organen bzw. Geweben bleibt, wobei zur Aufbewahrung des injizierten Zuckers in Form von freiem Zucker Blut und Haut die wichtigste Rolle spielen.

Während bei solchen Untersuchungen über den Zuckergehalt oder die Zuckerregulierungsfunktion der Haut nur die Reduktionswerte zur Messung kamen, lehrt uns die Gewebezuckerbestimmungsmethode nach Yamamoto, dass in der Haut wie bei den anderen Geweben auch gebundener hydrolysierbarer Zucker ausser freiem Zucker und Glykogen enthalten ist. Deshalb kann man mit der blossen Messung des Reduktionswertes aus Wassereextrakt keine Aufschlüsse über den Gehalt der Haut an wahren Zucker oder über das Gesamtbild beim intermediären Zuckerstoffwechsel der Haut erhalten. Daher wurden die Zuckerbilder der Haut zuerst einer Analysierung unterzogen, indem gleichzeitig die Zuckerbilder der Leber und des Muskels mit einander verglichen wurden, wobei Verf. sich auf die Yamamotosche Methode stützte. Dann wurde beobachtet, wie die Zuckerbilder der Haut bei abnormem Zuckerstoffwechsel beeinflusst werden, um die Bedeutung der Zuckerregulierungsfunktion der Haut beim intermediären Zuckerstoffwechsel zu erklären.

II. Teil:

VORBEMERKUNGEN ZUR METHODE.

Die zu untersuchende Hautstelle des Kaninchens wurde 3 Stunden vor dem Versuch glatt rasiert und gut gewaschen. Die Hautstücke wurden mit einer scharfen Schere möglichst blutfrei ausgeschnitten und vom subkutanen Fettgewebe abgetrennt. Die herauszuschneidenden Hautstücke müssen ein Gewicht von ungefähr 1 g und eine Länge von 3,5 cm sowie eine Breite von 1,5 cm besitzen. Nach der Abtrennung des Hautstückes werden die Wundränder vernäht.

Die Hautstücke wurden genau gewogen und nach der Orzinschwefelsäuremethode nach Yamamoto untersucht, um den Gehalt an freiem, wirklichem Zucker, hydrolysierbarem Zucker und Glykogen zu bestimmen.

III. Teil:

DIE VERSUCHSERGEBNISSE.

1. *Hautzuckerspiegel beim normalen Kaninchen.*

Zur Vergleichung des Hautzuckerspiegels (des Gesamtkohle-

hydratgehaltes, freien Zuckers, hydrolysierbaren Zuckers und Glykogens) bei verschiedenen Körperteilen bei normalen Kaninchen wurden die Hautstuecke vom Rücken, Bauch und Schenkel fast stets in gleicher Grösse herausgeschnitten und der Analysierung nach der Yamamotoschen Methode unterzogen. Die dabei erreichten Resultate zeigt Tabelle I.

TABELLE I.

Hautzuckerspiegel in verschiedenen Körperteilen (Rücken, Bauch und Schenkeln) des normalen Kaninchens.

Nr.	Datum u. Körpergewicht	Blut-zucker	Haut-partien	Gesamt-Kohlehyd. mg%	Freier Zucker mg%	Hydrol. Zucker mg%	Glykogen mg%
I	15/X	108	R	552	298	163	91
			B	530	288	162	80
	1,952		S	535	288	167	80
II	8/X	90	R	594	268	237	89
			B	515	225	220	70
	1,604		S	558	238	238	82
III	10/XI	99	R	500	230	200	70
			B	530	236	224	70
	1,760		S	530	248	210	72
IV	15/XI	85	R	510	234	202	74
			B	534	234	220	80
	1,870		S	550	256	220	74
V	18/XI	90	R	550	242	214	94
			B	516	222	204	90
	1,940		S	504	206	218	80

R = Rücken.

B = Bauch.

S = Schenkel.

Wie Tabelle I zeigt, war der Hautzuckerspiegel sowohl beim Gesamtkohlehydrat als auch bei einzelnen Zuckerfaktoren fast

immer gleich. Nur bei der Bauchhaut zeigte sich der Wert an Gesamtkohlehydrat etwas niedriger, was aber gegenüber dem Wert bei der Rückenhaut eine Verminderung um nur 5% bedeutet.

Tabelle II zeigt die Durchschnittswerte des Gesamtkohlehydrates und der einzelnen Zuckerfaktoren bei 15 Hautstücken von 5 Serien.

TABELLE II.

Durchschnittswerte des Hautzuckers von verschiedenen Körperteilen bei normalen Kaninchen.

Blut- zucker	Haut- partien	Gesamt- Kohlehyd. mg%	Freier Zucker mg%	Hydrol. Zucker mg%	Glykogen mg%
	R	540	254	203	83
	B	525	241	206	78
	S	535	247	210	78
94		533	247	206	79

R = Rücken.

B = Bauch.

S = Schenkel.

Unter einzelnen Zuckerfaktoren hat man bisher in der Literatur nur die Ergebnisse über die Bestimmung des Reduktionswertes aus dem Wasserauszug der Haut berichtet. Die Werte zeigen jedoch bei den einzelnen Untersuchern keine Übereinstimmung. Alle betreffenden Autoren geben je verschiedene Ergebnisse des Reduktionswertes mit mehr oder weniger grossen Schwankungen bekannt.

Nachfolgend werden die vom Verf. erreichten Werte an freiem tatsächlichem Zucker, die den sog. Reduktionswerten der einzelnen Zuckerkomponente entsprechen dürften, mit denen von anderen Autoren angegebenen Reduktionswerten der Haut verglichen. (Tabelle III.)

Hier könnten eigentlich die bei der Bestimmung des Hautzuckers reduzierenden Substanzen mitbestimmt werden. Aber weil der von mir gemessene freie Zucker der Haut der wirkliche Zuckerwert ist, so sind hier keine reduzierenden Substanzen mitbestimmt. Dieser freie, wirkliche Zucker der Haut bei normalen Kaninchen betrug aber etwa 2 mal höhere Werte als bei den anderen Autoren.

TABELLE III.

Untersucher	Versuchstierarten	Reduktionswert der Haut ^(Δ) od. freier, wirklicher Zucker der Haut ^(⊙) mg%	Blutzucker mg%
1. Palmer	Hund (ohne Anästhesie)	Δ 20	110
2. Folin	Hund (mit Anästhesie)	Δ 67	84
3. Urbach	Kaninchen	Δ112	107
4. Tukada	Kaninchen	Δ133	105
5. Miyake u. Narahara	Kaninchen	Δ111	105
6. Verfasser	Kaninchen	⊙248	94

Dass sich bei anderen Autoren so beträchtlich niedrigere Werte ergaben, kommt vielleicht daher, dass man dabei Wasserauszüge benutzte, was für die Extraktion ungenügend war. Im Gegensatz dazu wurden die Hautstücke vom Verf. (nach Yamamotoscher Methode) unter Einwirkung von Säure und Lauge zu vollständig klarer Lösung gebracht, um im Hautgewebe eingeschlossene einzelne Zuckerfaktoren, d. h. freien Zucker, Glykogen und hydrolysierbaren Zucker, freizulegen. Auf diese Weise kann immer der wahre Gehalt der Zuckerfaktoren erreicht werden. Es liegen in der Literatur nur spärliche Veröffentlichungen über den Glykogengehalt vor, ausgenommen Folin, der über Hundehaut, und Dittmar, der über Rattenhaut berichtet.

2. Die Hautzuckerbilder bei verschiedenen Tieren.

Es handelt sich um vergleichende Versuche, bei denen die Hautzuckerbilder bei Kaninchen, Huhn, Taube, Meerschweinchen, Ratte, Maus, Frosch und Kröte miteinander verglichen wurden, um dann die Zuckerbilder der Leber und des Skelettmuskels des einzelnen Tieres gegenüberzustellen. Die erreichten Resultate zeigt Tabelle IV.

Wie Tabelle IV zeigt, sind bei sowohl Gesamtkohlehydrat als

TABELLE IV.
Die Zuckerbilder der Leber, des Skelettmuskels und der Haut
bei verschiedenen Tierarten.

Tierarten	Datum	Organ u. Gewebe	Gesamt- Kohlehydr. mg%	Freier Zucker mg%	Hydrolys. Zucker mg%	Glykogen mg%
Kaninchen	10/10	L	3996	996	410	2590
		M	870	260	200	410
		H	554	254	207	93
Huhn	31/10	L	3046	1980	316	750
		M	500	250	162	88
		H	500	194	206	100
Taubе	30/11	L	4920	1622	394	2904
		M	1532	202	320	1010
		H	480	200	198	82
Ratte	19/9	L	4110	1110	476	2524
		M	684	240	224	220
		H	516	212	200	104
Meer- schweinchen	25/12	L	1432	544	404	484
		M	676	236	208	222
		H	420	146	180	94
Maus.	15/9	L	5540	3940	688	912
		M	688	288	296	104
		H	520	236	210	74
Frosch	15/7	L	5814	3150	728	1846
		M	760	160	140	440
		H	666	266	264	136
Kröte	20/7	L	10660	3240	3832	3428
		M	1332	222	510	600
		H	666	222	328	116

L = Leber.

M = Skelettmuskel.

H = Haut.

auch bei einzelnen Zuckerkomponenten der Haut bei verschiedenen Tieren die Werte ausnahmslos annähernd gleich, was auffallend ist. Die Gesamtkohlehydratwerte der Haut liegen zwischen dem Minimalwert bei Meerschweinchen von 420 mg% und Maximalwert bei Kröte von 666 mg%. Auch bei einzelnen Zuckerkomponenten der Haut von verschiedenen Tieren betrugen die hydrolysierbaren Zuckerwerte nur bei Kröte und Frosch die abnorme Höhe von ungefähr 300 mg%, bei allen sonstigen Tieren ergaben die Werte etwa 200 mg%.

Weiter werden die Zuckerbilder der Haut mit den Zuckerbildern der Leber und des Skelettmuskels bei einzeitigem Tier verglichen. Es ist dabei interessant, dass die Zuckerbilder der Leber und des Muskels sowohl bei Gesamtkohlehydrat als auch bei einzelnen Zuckerkomponenten beträchtliche Schwankungen zeigen, während sie bei den Zuckerbildern der Haut aller Tiere sehr gering sind. Aus dieser Tatsache lässt sich erkennen, dass die Funktion der Haut gegenüber Kohlehydratstoffwechsel bei Tieren fast keine Verschiedenheiten zeigt, während die Funktion der Leber oder des Skelettmuskels ziemlich deutliche Unterschiede aufweist.

3. *Die Hautzuckerbilder bei hungernden Kaninchen.*

Es wurden Bestimmungsuntersuchungen vorgenommen, bei denen die Hautzuckerbilder des hungernden Kaninchens in der ersten Periode (4.–5. Hungertag) und in der späteren (7.–8. Hungertag) gemessen wurden. (Tabelle V)

In der ersten Hälfte der Hungerperiode (4.–5. Hungertag) erkennt man bei den Zuckerbildern an den Werten von Gesamtkohlehydrat, Glykogen, wirklichem und hydrolysierbarem Zucker keine Veränderungen. Aber in der späteren Periode (7.–8. Hungertag) zeigte sich bei dem wirklichen, freien Zuckergehalt der Kaninchenhaut eine ziemlich deutliche Abnahme (46,2%), beim Gesamtkohlehydrat 15%, beim Glykogengehalt 27%. Dabei bleibt aber der hydrolysierbare Zuckergehalt der Haut immer unverändert.

4. *Die Einflüsse der Zuckerinfusion auf die Hautzuckerbilder.*

Dem Kaninchen wurde 10 ccm 20%iger Glukoselösung (2 g

TABELLE V.
Resultate der an 7 hungernden Kaninchen ausgeführten Versuche (Durchschnittswerte).

	Körper- gewicht	Blutzucker		Gesamt- Kohlehydrat		Freier Zucker		Hydrolys. Zucker		Glykogen	
		mg%	Abnahme- Prozent	mg%	Abnahme- Prozent	mg%	Abnahme- Prozent	mg%	Abnahme- Prozent	mg%	Abnahme- Prozent
Vor d. Versuch	1,866	98		610		278		228		104	
4-5 Tage Hunger	1,486	97		599	1,8	268		232		99	4,8
7-8 Tage Hunger	1,266	83	15,3	442	27,5	143	48,5	222	2,6	76	26,9

pro kg) intravenös injiziert. Die Hautstücke wurden zuerst vor und dann nach der Injektion (1 und 2 Stunden, $\frac{1}{2}$ und 2 Stunden, $1\frac{1}{2}$ und 3 Stunden oder $\frac{1}{2}$ und 3 Stunden nach der Injektion) zur Bestimmung der Hautzuckerbilder herausgeschnitten. Gleichfalls wurden auch die Zuckerbilder beim Skelettmuskel zum Ver-

TABELLE VI (A).

Der Zuckerspiegel der Haut bei normalen Kaninchen nach
Glukoselösungsinfusion.
(20% Glukoselösung pro kilo 10 ccm intravenös.)

Kaninchen Nr. Körper- gewicht	Zeit der Zucker- infusion	Gesamt- Kohlehydr. mg%	Freier Zucker mg%	Hydrol. Zucker mg%	Glykogen mg%	Blutzucker mg%
1 1,83	Vor	510	226	204	80	89
	nach 60 Min.	704	398	196	110	313
2 2,06	Vor	544	258	192	94	90
	nach 30 Min.	570	264	202	104	364
	nach 120 Min.	828	494	202	132	203
3 2,00	Vor	553	230	225	98	92
	nach 60 Min.	780	420	238	122	346
	nach 120 Min.	762	390	242	130	254
4 2,00	Vor	524	234	190	100	101
	nach 90 Min.	760	440	184	136	334
	nach 180 Min.	640	326	184	132	194
5 1,93	Vor	500	216	212	72	90
	nach 30 Min.	550	266	208	76	400
	nach 180 Min.	606	298	198	110	170
6 1,75	Vor	532	248	194	90	90
	nach 60 Min.	734	384	208	142	
	nach 120 Min.	650	328	196	126	

TABELLE VI (B).

Durchschnittswerte des Zuckers der Haut bei normalen Kaninchen
nach Glukoselösunginfusion.

Zeit der Zucker- infusion (Minuten)	Gesamt- Kohlehyd.		Freier Zucker		Hydrolys. Zucker		Glykogen		Blut- zucker	
	mg%	Z.P. %	mg%	Z.P. %	mg%	Z.P. %	mg%	Z.P. %	mg%	Z.P. %
Vor	522		237		202		83		90	
nach 30 Min.	560	7	265	12	205	1	90	8	382	324
Vor	530		234		207		39		89	
nach 60 Min.	740	40	401	71	214	3	125	40	329	269
Vor	524		234		190		100		101	
nach 90 Min.	760	44	440	88	184	0	136	36	334	231
Vor	542		245		203		94		90	
nach 120 Min.	746	35	404	65	213	4	129	37	229	154
Vor	512		225		201		86		96	
nach 180 Min.	614	21	302	34	191	0	121	41	182	90

Z.P. = Zunahme Prozent.

gleich festgestellt. Die Resultate zeigt Tabelle VI. (Anm. Bei allen Tieren wurden die gleichen Skelettmuskeln der hinteren wie vorderen Extremitäten zu Untersuchung verwendet.)

Mit einer intravenösen Injektion der Glukoselösung (2 g pro kg) erkennt man bei hydrolysierbaren Zuckerwerten sowohl an der Haut als auch am Skelettmuskel keine Änderungen, während die Werte bei freiem Zucker und bei Glykogen der Haut wie des Muskels beträchtlich zunahmen. So ist bei freiem Zucker (der Haut wie des Muskels) $\frac{1}{2}$ Stunde nach der Infusion geringe, aber 1 Stunde danach deutliche (bei der Haut) oder ziemlich deutliche (beim Muskel) Vermehrung wahrzunehmen. Und so erreichten die Werte sowohl bei der Haut als auch beim Muskel 1–2 Stunden nach der Infusion ihre Maximalwerte. Dann beginnen sie sowohl

TABELLE VI (C).

Der Zuckerspiegel des Skelettmuskels bei normalen Kaninchen
nach der Glukoselösungsinfusion.

(20% Glukoselösung pro kilo 10 ccm intravenös.)

(Mittelwerte bei je 2 Kaninchen.)

Zeit der Zucker- infusion	Gesamt- Kohlehydrat		Freier Zucker		Hydrolys. Zucker		Glykogen	
	mg%	Z.P. %	mg%	Z.P. %	mg%	Z.P. %	mg%	Z.P. %
Vor	820		184		140		376	
nach 30 Min.	884	7	209	13	150	7	400	6
Vor	753		259		150		344	
nach 60 Min.	874	16	340	31	144		390	13
nach 120 Min.	915	21	325	25	140		470	37
Vor	802		270		182		350	
nach 180 Min.	1023	27	321	19	191	4	511	46

Z.P. = Zunahme Prozent.

bei der Haut als auch beim Muskel 3 Stunden nach der Injektion abzusinken. Beim Vergleich der maximalen Werte des freien Zuckers zeigte sich der Wert bei der Haut 2 mal höher als der beim Muskel.

Beim Glykogenwert ist die Vermehrung erst 1 Stunde nach der Zuckerinfusion wahrzunehmen. Die Prozente der Zunahme sind bei der Haut nicht so schwankend, und sie betragen binnen 1–3 Stunden nach der Injektion ungefähr 40%. Beim Skelettmuskel nehmen die Werte aber mit der Zeit zu, was 3 Stunden lang andauert. Zwar ist der Zunahmeprozentsatz 1 Stunde nach der Injektion bei der Haut grösser, und 2 Stunden danach beim Muskel grösser. Bei beiden Fällen ist der maximale Zunahmeprozentsatz ganz gleich, er betrug 40%.

Aus diesen Ergebnissen kann man schliessen, dass die Zuckerregulierungsfunktion bei der Haut stärker ist als beim Muskel (Kaninchen).

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die bisher in der Literatur als Hautzucker bezeichneten Werte sind nur die Reduktionswerte, welche aus dem Wasserauszug der Haut extrahiert werden. Der Verfasser hat in Anwendung der Yamamoto'schen Methode bei Kaninchen Messungsversuche vorgenommen, um die Werte von Gesamtkohlehydrat, freiem Zucker, hydrolysierbarem Zucker und Glykogen beim normalen bzw. abnormalen Kohlehydratstoffwechsel zu bestimmen.

2. An Hautzuckerspiegeln von verschiedenen Körperpartien (Rücken, Bauch und Schenkel) sind beim normalen Kaninchen nur wenige Schwankungen nachzuweisen. Die Werte des Hautzuckerspiegels stellten sich durchschnittlich wie folgt:

Gesamtkohlehydrat 533 mg%, freier Zucker 247 mg%,
hydrolysierbarer Zucker 206 mg%, Glykogen 79 mg%.

3. Aus analysierenden Versuchen der Zuckerbilder der Haut, der Leber und des Skelettmuskels bei Kaninchen, Huhn, Taube, Meerschweinchen, Ratte, Maus, Frosch und Kröte ergab sich, dass die Werte bei der Leber und dem Muskel sowohl an Gesamtkohlehydrat als auch an einzelnen Zuckerkomponenten je nach den Arten der Tiere ausgeprägte Schwankungen zeigen, während bei der Haut der Gesamtkohlehydrat sowie die einzelne Komponente nur geringe Schwankungen aufweisen.

4. Bei hungernden Kaninchen zeigten die Hautzuckerbilder in der ersten Hälfte der Hungerperiode (4.-5. Hungertag) keine Änderungen gegenüber den normalen Tieren. In den späteren Stadien (7.-8. Hungertag) erwies sich der freie Zuckergehalt der Haut um 49% niedriger als der bei Kontrolltieren. Während die Werte beim Glykogengehalt um 27%, Gesamtkohlehydrat um 28% niedriger waren, blieb der Gehalt an hydrolysierbarem Zucker unverändert.

5. Bei der intravenösen Injektion von Glukoselösung (2 g pro kg) erkennt man an hydrolysierbarem Zuckergehalt sowohl bei der Haut als auch bei dem Muskel keine Änderungen, während an freiem Zucker- und Glykogengehalt (der Haut und des Muskels)

Vermehrungen in grösserem Masse wahrzunehmen sind. Und so erreichte die Zunahmekurve des freien Zuckers der Haut wie des Muskels 1-2 Stunden nach der Zuckerinfusion ihre maximale Höhe, um dann 3 Stunden nach der Infusion ziemlich deutliches Absinken zu zeigen. Der maximale Zunahmeprozentsatz war bei der Haut 2 mal höher als beim Muskel. Die Zunahmekurven des Glykogengehaltes sind bei der Haut und beim Muskel nicht verschieden, wobei die Zunahme 40% beträgt. Aber die Zeitdauer in der der Zunahmeprozess vor sich geht, ist verschieden.

Es ist eine angenehme Pflicht, Herrn Dr. M. Takeda für seine stets bereditwillige Leitung und Herrn Prof. S. Kakiuchi (an der Kaiserlichen Universität zu Tokio) für seine Korrekturen auch an dieser Stelle meinen Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Bang (1913): Der Blutzucker.
Dittmar (1933): Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmak., **141**, 496.
Folin, Trimble and Newman (1927): J. Biol. Chem., **75**, 263.
Miyake und Narahara (1930): Kumamoto Igakukai Zassi, **6**.
Narahara (1932): Hihu u. Hinyokika Zassi, **32**.
Palmer (1917): J. Biol. Chem., **30**, 79.
Tukada (1930): Hihu u. Hinyokika Zassi, **30**.
Urbach (1929): Biochem. Zeitschr., **196**.
Yamamoto (1940): J. Biochem., **32**, 161 u. 389.

ÜBER DIE GEWEBEPROTEOLYSE.

II. Mitteilung. Über die ereptasefreie Katheptase-Wirkung und die katheptische Acyldipeptidase-Wirkung.

VON

TOORU SAKAI.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Tohoku-Universität (Sendai) und aus dem Utzino-Laboratorium des Instituts für Chemische Forschung an der Kaiserlichen Universität Kyoto. Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)

(Eingegangen am 29. Dezember 1942)

Nachdem bereits über die verschiedenen Prozeduren betreffs der Unterscheidung unter den Gewebeproteasen von Waldschmidt-Leitz und seinen Mitarbeitern (1927 u. 1930) berichtet worden war, gelang es Utzino und dem Verf. (1941) mit gutem Erfolg, ein sehr einfaches Säure- und Alkali-Verfahren zur Unterscheidung zwischen Katheptase und Ereptase der Schweineleber aufzufinden. Die Arbeit wurde schon kurz veröffentlicht, obwohl nur einzelne Substrate bei den Versuchen mit Schweineleber zur Verfügung standen. Darauf hin hat auch Hirooka (1942) die Spaltung der Peptonkörper verschiedener Herkunft durch ereptasefreie Katheptase beobachtet.

In der weiteren Fortführung dieser Forschung hat sich Verf. hier unter Leitung von Prof. Dr. Utzino mit dem Studium der Trennung dieses sauren oder alkalischen Proteasensystems der Leber, Niere und Milz des Schweines unter Anwendung verschiedener Substrate beschäftigt, um weiter in die Spezifitätsfrage dieser Proteasen einzugehen.

Um der Ereptasewirkung vorzubeugen, bewahrte man die Gewebemazeration bei PH 4 und bei 37°C 40 Min. lang auf und prüfte das Enzym-Präparat auf seine Aktivität bei PH 4,5; im Gegensatz zu dieser Prozedur kam die Alkali-Behandlung der Mazeration bei PH 9,5 und bei 37°C 60 Min. lang zur Gewinnung

der katheptasefreien Ereptase der Gewebe. Das Leberpräparat, bei dem die Ereptase-Wirkung nach der Säurebehandlung nicht beobachtet werden konnte, vermag noch in deutlichem Grade Casein, Albumine, Edestin neben Gelatine anzugreifen und diese Wirkung wurde stark durch den Cystein-Zusatz aktiviert (Tabelle I). Das Enzym war nur nach der Cysteinaktivierung imstande, das Fibrin zu hydrolysieren. Auf Grund dieser Ergebnisse kann man wohl mit Sicherheit die ereptasefreie Kathepsin-Wirkung des mit Säure behandelten Leberpräparats annehmen (Tabelle I). Die hier geprüften Peptonpräparate der verschiedensten Firmen wurden auch durch dieses ereptasefreie Leberpräparat bei pH 4,5 angegriffen und noch etwas stärker nach der Cysteinaktivierung (Tabelle I). Die schwankenden Werte der Spaltung mögen wohl von den verschiedenen Abbaustufen der käuflichen Peptonarten herrühren. Das Witte-Pepton zeigte einen starken Hydrolysenwert besonders nach dem Cysteinzusatz. Dies kommt vielleicht daher, dass das Witte-Pepton eine höhere Abbaustufe als andere Peptone hat. Das Gelato-Pepton (Chen et al., 1940) hat man als Abbauprodukt aus dem Gelatine-Digestat bei pH 2,0 durch Aceton-zusatz ausgefällt, nachdem die Spaltung nach wiederholter Digestion mit erneutem Zusatz der Magenmucosa-Mazeration den maximalen Wert erreicht hatte (Tabelle I). Diese Beobachtung der katheptischen Peptonspaltung erinnert an die vorangegangene Angabe (Utzino und Sakai, 1941) und eine diesbezügliche Mitteilung dürfte demnächst veröffentlicht werden. Hier sei besonders hervorgehoben, dass das Enzympräparat nur Benzoyldiglycin bei pH 4,5 hydrolysieren konnte, während sich Diglycin, Leucyldiglycin, Hippursäure, Chloracetylphenylalanin, Chloracetyl-leucin und Bromisocapronylglycin diesem katheptischen Enzym gegenüber sehr widerstandsfähig erwiesen (Tabelle I). Auf Grund dieser Ergebnisse möchte man wohl mit grösster Wahrscheinlichkeit die Annahme bestätigen, dass man durch das Säure-Verfahren bei pH 4 und bei 37°C (40 Min. lang) eine Ausschaltung der Ereptase-Wirkung erzielen kann und dass in dem nach dieser Prozedur gewonnenen Enzympräparat nur die Katheptase-Wirkung erhalten bleibt, die eine saure Proteinase-Wirkung (Kathepsin im

engeren Sinne), eine saure Peptonase-Wirkung (vorläufig schlechtweg Kathopeptonase) und eine Karboxypeptidase-Wirkung (Acyldipeptidase) zeigen kann. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen bewahrte man die Lebermazeration bei pH 9,5 und 37°C eine Stunde lang auf, um die Ausschaltung der Katheptase-Wirkung der Schweineleber zu bestätigen. In guter Übereinstimmung mit der früheren Angabe (1941) erwies sich das behandelte Enzympräparat bei pH 4,5 als inaktiv gegenüber Gelatine, Witte-Pepton und Benzoyldiglycin, während es Pepton, Leucyldiglycin, Diglycin, Benzoyldiglycin, Benzoylglycin, Chloracetyl-leucin und Chloracetyl-phenylalanin bei pH 7,2 im deutlichen Grade anzugreifen vermochte, nicht aber Bromisocapronylglycin (Tabelle II). Der Cysteinzusatz blieb ohne Einfluss auf die Benzoyldiglycin-Spaltung bei pH 7,2 durch das Leberenzym. Um diese ereptasefreie Katheptase-Wirkung auch in den anderen Organen zu bestätigen, wurden Mazerationen von Schweineniere und Schweinemilz dem Säure-Verfahren bei pH 4 unterworfen und dann auf ihre Aktivität bei pH 4,5 und bei pH 7,5 hin geprüft. Genau wie erwartet, konnte man in diesen Präparaten nur die katheptische Peptonase- und Karboxypeptidase-Wirkung bei pH 4,5 konstatieren, während die Ereptase-Wirkung vollständig vermisst wurde (Tabelle III, IV u. V). Hier sei kurz erwähnt, dass das Nierenpräparat auch nach dem Alkali-Verfahren eine starke Hippurase-Wirkung bei pH 7,5, nicht aber bei pH 4,5 aufwies. Merkwürdigerweise muss betont werden, dass die Benzoyldiglycin-Spaltung durch dieses ereptasefreie Milzpulver bei pH 4,5 nach Zusatz von Cystein oder H_2S deutlich aktiviert werden konnte, während der Cysteinzusatz die Hydrolyse durch das Leberpräparat fast nicht beeinflusste, wie dies früher (1941) bereits gesagt wurde (Tabelle I u. V). Die Beobachtung, dass diese Karboxypeptidase-Wirkung nicht nur bei pH 4,5 auftritt, sondern auch durch Cysteinzusatz aktivierbar ist, dürfte wohl für die Annahme sprechen, dass diese Karboxypeptidase katheptischer Natur ist, die sich nach den folgenden Ergebnissen als Acyldipeptidase erweist. Zuletzt kommt die Spaltungsstelle des Benzoyldiglycins durch die ereptasefreie Katheptase verschiedener Organpräparate in Frage. Wie schon durch Utzino

und Sakai (1941) berichtet wurde, konnte man auch hier Hippursäure aus dem Benzoyldiglycin-Digestat mit der Leberkatheptase isolieren und auch dieselbe Säure aus dem Digestat bei pH 4,5 mit der Milz- und der Nieren-Katheptase, die sich als ereptasefrei erwies (Tabelle VI, VII u. VIII). Hiermit hat Verf. in guter Übereinstimmung mit der vorangegangenen Angabe, die Acyldipeptidase in der katheptischen Karboxypeptidase-Wirkung der Leber, Milz und Niere bestätigt.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Durch das Säure-Verfahren (pH 4, 37°C 40 Min.) wurde die Ausschaltung der Ereptase-Wirkung der Leber, Niere und Milz des Schweins erzielt und die ereptasefreie Katheptase-Fraktion gewonnen. Diese Fraktion vermag Proteine wie Gelatine, Casein, Albumine und Edestin und ebenfalls Peptone von verschiedener Herkunft anzugreifen und die Spaltung wurde durch den Cystein-zusatz deutlich aktiviert. Diesem Enzympräparat widerstanden Diglycin und Leucyldiglycin.

2. In dieser ereptasefreien Katheptase-Fraktion wurde eine Acyldipeptidase-Wirkung bestätigt, da die Hippursäure als Abbau-produkt des Benzoyldiglycins isoliert wurde. Das Enzym war jedoch nicht imstand, Hippursäure, Chloracetyl-leucin, Chloracetyl-phenylalanin, Bromisocapronylglycin zu hydrolysieren. Merkwürdigerweise wirkte Cystein aktivierend auf das Milzenzym, nicht aber auf das Leberenzym.

3. Diesem Ergebnis entgegen wurde die Katheptase-Wirkung der Schweineleber betreffs der Gelatine, des Witte-Peptons und des Benzoyldiglycins durch das Alkaliverfahren (pH 9,5, 37°C 60 Min.) vernichtet, während die Ereptase-Wirkung deutlich erhalten blieb, die Witte-Pepton, Leucyldiglycin, Diglycin, Hippursäure, Benzoyldiglycin, Chloracetyl-leucin, Chloracetylphenylalanin nicht aber Bromisocapronylglycin bei pH 7,2 anzugreifen vermag.

Dem Unterrichtsministerium sei an dieser Stelle bestens gedankt für die Gewährung einer Unterstützung zur Anregung wissenschaftlicher Forschungen.

Prof. Dr. S. Utzino.

Experimenteller Teil.

TABELLE I.

Ereptasefreie Katheptasewirkung der Schweineleber.

Nach der Vorschrift der vorangegangenen Abhandlung (Utzino u. Sakai, 1941) zerrieb man Leberbrei (Schwein) gut mit der 1,5fachen Volummenge Wasser und kolierte die Mazeration durch Gaze. Diese Mazeration liess man nach Einstellen bei P_{H} 4 mittels 3%iger Salzsäurelösung bei P_{H} 37°C 40 Min. lang stehen. Darauf wurde die Mazeration bei P_{H} 5 mit 3%iger Natronlauge eingestellt und nach der Aceton-Äther-Methode getrocknet. Bei den Versuchen kam eine 10%ige Suspension in Wasser zur Anwendung.

Versuchsansatz: 5 ccm 8%ige Protein-, Pepton- oder 0,2 Mol-Peptid-Pufferlösung + 11 ccm Phosphatpuffer + 2 ccm Enzymlösung mit 2 ccm 0,1 Mol Cysteinlösung oder mit 2 ccm Wasser zur Kontrolle + Toluol; digeriert bei 37°C.

Für die Aktivierung der katheptischen Wirkung liess man je 2 ccm Enzym-Suspension mit 2 ccm 0,1 Mol Cystein HCl-Lösung (neutralisiert) bei P_{H} 6 und 37°C 30 Min. lang stehen.

Bei den Kontrollversuchen wurden nur 2 ccm Wasser oder Phosphatpuffer anstatt Cysteinlösung hinzugefügt aber sonst in der gleichen Weise wie im Hauptversuche vorgegangen. Zur Prüfung der ereptischen Wirkung wurden 5 ccm Substratlösung, 2 ccm Enzymlösung und 13 ccm Phosphatpuffer verwendet.

Die Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat wurde nach Sörensen und die Aminostickstoffzunahme in 2 ccm Digestat nach Van Slyke bestimmt. Die Kontrollwerte sind von den Hauptversuchswerten abgezogen und die Differenzwerte in Tabellen angegeben.

TABELLE I.

Aciditätszunahme in 4 cem Digestat (cem 0,1 n-NaOH) (* NH ₂ -N Zunahme in 2 cem (mg))													
Substrate	pH	4,5						7,2					
		a) ohne Cystein		b) mit Cystein		Aktivierungszunahme (b-a)							
		24	72	120	24	72	120	24	72	120			
Gelatine (Merck)		0,38	0,88	1,03	0,51	1,1	1,48	0,13	0,22	0,45	0	0	0
Casein (Hammarsten)		0,32	0,67	0,7	0,65	1,2	1,29	0,33	0,53	0,59	0	0,02	0
Serumalbumin (Merck)		0,01	0,68	0,65	0,62	1,05	1,22	0,61	0,37	0,57	—	—	—
Ovalbumin (Merck)		0,04	0,44	0,49	0,25	0,85	0,9	0,21	0,41	0,41	—	—	—
Fibrin (Rind)		0,02	0	0,05	0,01	0,3	0,48	—0,01	0,3	0,43	—	—	—
Edestin		0,02	0,32	0,48	0,37	0,59	0,64	0,35	0,27	0,16	—	—	—
Pepton (Witte)		0,48	0,65	0,77	1,09	1,79	1,89	0,61	1,14	1,12	—0,03	—0,03	0,03
Pepton (K A) ²⁾		0,44	0,66	0,74	0,61	1,09	1,07	0,17	0,43	0,33	—0,03	0	0,07
Pepton (K B)		0,41	0,8	1,0	0,65	1,08	1,23	0,24	0,28	0,23	0,02	0,05	0,02
Pepton (P)		0,23	0,33	0,35	0,38	0,73	0,68	0,15	0,4	0,33	—	—	—
Gelatopepton (Chen, 1940)		0,18	0,4	0,52	0,28	0,63	0,73	0,01	0,23	0,21	—	—	—
d, l-Leucyldiglycin		0,02	0,08	0,08	—	—	—	—	—	—	0,02	0,05	0,07
Glycylglycin *		0,05	0,08	0,06	—	—	—	—	—	—	0	0	0,15
Benzoyldiglycin		0,17	0,38	0,51	0,11	0,37	0,59	—0,06	—0,01	0,08	0,01	0,02	0,01
Hippursäure		0,04	0,03	0,08	—	—	—	—	—	—	0,06	0,06	0,08
Chloracetyl-l-phenylalanin *)		0,001	0,001	0	—	—	—	—	—	—	0,01	0	0
Chloracetyl-l-leucin *)		0,005	0,002	0,002	—	—	—	—	—	—	—	—	—
d, l-Bromisocapronylglycin *)		0,001	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—

1) Für Pepton K A wurde eine 16% Lösung gebraucht.

TABELLE II.

Katheptasefreie Ereptasewirkung der Schweinsleber.

Anders als bei der Ereptasebefreiung wurde hier die Lebermazeration, die mit 1 Teil Leberbrei und mit dem 1,5fachen Volumen Wasser bereitet und koliert wurde, nach Einstellen bei pH 9,5 mittels 3%iger Natronlauge bei 37°C 60 Min. lang stehen gelassen, um die Katheptasewirkung zu vernichten.

Versuchsansatz: Ebenso wie in der Tabelle I.

TABELLE II.

Aciditätszunahme in 4 cem Digestät (cem 0,1 n-NaOH) (* NH ₂ -N Zunahme in 2 cem (mg))							
pH		7,2			4,5 (mit Cystein)		
Zeit(Std.)		24	72	120	24	72	120
Substrate							
Gelatine (Merek)		0,01	0	0	0	0	0,08
Pepton (Witte)		0,55	0,73	0,98	0,03	0,08	0,08
Glycylglycin		0,75	1,42	1,58		—	
d, l-Leucyldiglycin		0,49	0,59	0,68		—	
Benzoyldiglycin		0,23	0,83	1,38	0	0,05	0,08
Hippursäure		0,05	0,27	0,57		—	
Chloracetyl-l-phenylalanin*)		0,234	0,561	0,56		—	
Chloracetyl-l-leucin*)		0,475	0,493	0,492		—	
Bromisocapronylglycin*)		0	—0,005	0,005		—	

Um die Frage zu beantworten, ob die ereptische Benzoyldiglycin-Spaltung durch Cystein-Zusatz gefördert wird oder nicht, prüfte man hier die Aktivität der katheptasefreien Leberereptase nach Zusatz von Cystein, indem man einen Ansatz mit 10 ccm 0,1 Mol-Benzoyldiglycin (als Na-Salz), 6 ccm Phosphatpuffer und 2 ccm Leberereptaselösung (katheptasefrei), die vorher mit 2 ccm 0,1 Mol-Cysteinlösung bei 37°C und pH 6 während 30 Min. aufbewahrt wurde, der Digestion bei pH 7,5 unterwarf. Zur Kontrolle wurden 2 ccm Enzymlösung nur mit 2 ccm Wasser ohne Cystein bei pH 6 und 37°C 30 Min. lang behandelt und im Ansatz verwendet. Die Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat betrug nach 24,

72 und 120 Stunden; a) ohne Cystein 0,15, 0,45 und 0,6 und b) mit Cystein 0,11, 0,5 und 0,63 cem 0,1 *n*-NaOH respektive.

TABELLE III.

Ereptasefreie Katheptasewirkung der Schweineniere.

Nach der Behandlung der Nieren-Wasser-Mazeration, die aus 1 Teil Schweinenierenbrei und 2 Volumteilen Wasser bestand und durch Gaze koliert wurde, bei P_H 4 (mit 3% HCl eingestellt) und 37°C während 40 Min. wurde das Trockenpräparat nach der Aceton-Äther-Methode hergestellt. Beim Gebrauch wurde eine 10%ige Suspension in Wasser unter guter Zerreibung im Mörser bereitet.

Versuchsansatz: 5 cem Pepton- oder 10 cem 0,1 Mol Peptid-Lösung + 2 cem Enzymlösung + 13 oder 8 cem Phosphatpuffer (für P_H 4,5 und P_H 7,5) respektive + Toluol; digeriert bei 37°C.

TABELLE III.

Aciditätszunahme in 4 cem Digestat bei pH 4,5 (cem 0,1 <i>n</i> -NaOH)						
pH		4,5			7,5	
Substrate	Zeit(Std.)	24	72	120	24	72 120
Pepton (Witte)		0,58	0,88	0,95	0,03	0,05 0,07
Benzoyldiglycin		0,13	0,21	0,34	-0,03	0,02 0,02
Hippursäure		0	0,02	0,12	0,02	0 0
Diglycin		-0,01	0,09	0,14	-0,05	0,03 0,13
(Nach Alkali-Behandlung)		(pH 4,5)			(pH 7,2)	
Hippursäure*)		0,05	0,02	0,05	1,25	1,74 1,84

*) Zur Probe der Alkalibeständigkeit der Nierenereptase oder der Ausschaltung der Nierenkatheptase des Schweins durch das Alkali-Verfahren wurde die Nierenmazeration bei P_H 9,5 (mit NaOH) und 37°C 60 Min. lang stehen gelassen und getrocknet. Diese Trockenpräparat prüfte man auf seine Ereptase-Aktivität bei P_H 7,2 und auch auf die Katheptase-Aktivität bei P_H 4,5 für Hippursäure hin unter den gleichen Ansatzbedingungen.

TABELLE IV.

Ereptasefreie Katheptasewirkung der Schweinemilz.

Durch das Säure-Verfahren bei P_H 4 und $37^\circ C$ während 40 Min. wurde ein Trockenpräparat aus Milzmazeration des Schweins in derselben Weise wie in der Tabelle III bereitet. Eine 10%ige Suspension kam als Enzym zur Verwendung.

Versuchsansatz: Ebenso wie in der Tabelle III.

TABELLE IV.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)						
pH	4,5			7,5		
Zeit (Std.)	24	72	120	24	72	120
Substrate						
Pepton (Witte)	0,62	0,87	0,95	0,07	0,08	0,05
Benzoyldiglycin	0,25	0,68	0,79	0	-0,05	-0,05
Hippursäure	0,05	0,05	0,08	0,02	0	0
Diglycin	-0,05	0,03	0,01	0,03	0	0,03

TABELLE V.

Einfluss des Cystein- oder Schwefelwasserstoffzusatzes auf die ereptasefreie Milzkathepsin-Wirkung.

Zur Prüfung der Wirkung des Zusatzstoffes wurden je 0,2 g ereptasefreies Milzpulver (in Tabelle IV angegeben) in 2 ccm Wasser mit 2 ccm 0,1 Mol-Cystein-HCl-Lösung bei P_H 4 und $37^\circ C$ 30 Min. lang stehen gelassen oder mit 2 ccm Wasser versetzt und 30 Min. lang bei Zimmertemperatur mit SH_2 -Gas durchströmt.

Zur Kontrolle liess man 2 ccm Milzpulver-Suspension nur mit 2 ccm Wasser bei $37^\circ C$ 30 Min. lang stehen.

Versuchsansatz: 5 ccm 8%ige Pepton- oder 10 ccm 0,1 Mol Benzoyldiglycinlösung + 4 ccm Enzym-Cystein-, Enzym-Schwefelwasserstoff-Lösung oder Enzym-Wasser (Kontrolle) + 11 ccm oder 6 ccm Phosphatpuffer + Toluol; bei P_H 4,5 und $37^\circ C$ digeriert.

TABELLE V.

Aciditätszunahme in 4 cem Digestat bei PH 4,5 (cem 0.1 n-NaOH)							
Zusatzstoffe	Substrate	Pepton K B			Benzoyldiglycin		
	Zeit (Std.)	24	72	120	24	72	120
ohne Zusatz (Kontrolle)		0,75	1,13	1,28	0,38	0,53	0,73
Cystein		1,2	1,63	1,83	0,85	1,75	1,78
H ₂ S		1,09	1,24	1,41	1,5	1,8	1,73

TABELLE VI.

*Benzoyldiglycin-Spaltung durch die ereptasefreie Katheptase
der Schweineleber und Isolierung des
Spaltungsproduktes.*

100 ccm 0,05 Mol Benzoyldiglycin-Lösung (als Na-Salz gelöst und dann bei PH 4,5 mit Essigsäure korrigiert) und 2 g ereptase-freies Leberpulver in 10 ccm Wasser wurden mit Essigsäure bei PH 4,5 eingestellt und bei 37°C unter Toluol digeriert. Da die Leber-Katheptase in einem vollaktiven-Zustand gegenüber diesem Substrate auftrat, benutzte man hier das Enzym ohne Cystein. Nach 5tägiger Digestion fügte man weiter 10 ccm Enzym-Suspension (2 g ereptasefreies Leberpulver) dem Digestat hinzu. Kontrolle mit Enzym ohne Substrat im gleichen Verhältnis.

TABELLE VI.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)			
Zeit	Hauptversuch	Kontrolle	Zunahme
Sofort	1,15	0,63	0,72
5 Tage	2,6	1,4	
Zweiter Zusatz.			
Sofort	2,93	1,8	0,44
5 Tage	4,0	2,43	

Nach der zweiten Digestion wurde das Digestat mit Natron-lauge alkalisch gegen Curcuma-Papier gemacht, gut umgerührt und

von der nicht gelösten Substanz durch Faltenfilter abfiltriert. Das Filtrat, welches mit verdünnter Schwefelsäure schwach sauer gemacht und auf 20 ccm auf dem Wasserbade mittels Föns eingeeengt wurde, liess man nach Ansäuern mit H_2SO_4 gegen Kongorot im Extraktionsapparat mit Äther extrahieren.

Nach Abdampfen des Äthers schied sich eine kristallinische Masse (Ausbeute 0.24 g) ab, die aus heissem Wasser umkristallisiert wurde. Die Substanz schmolz bei 187°C und die Mischschmelzpunktprobe mit der Hippursäure ebenfalls.

Analyse: 21,5 mg Subst. 5,75 ccm 0,02 n- H_2SO_4 (Kjeldahl)

Ber. $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$ N 7,82%

Gef. N 7,49%

TABELLE VII.

Benzoyldiglycinspaltung durch die ereptasefreie Katheptase der Schweineniere und Isolierung des Spaltungsproduktes.

Ebenso wie bei den Versuchen mit Leber-Katheptase liess man hier 2 g ereptasefreies Katheptase-Pulver der Schweineniere auf 100 ccm 0,05 Mol-BenzoyldiglycineLösung bei PH 4,5 unter Toluol einwirken.

Nach dem zweiten Zusatz von 2 g Enzym in 10 ccm Wasser zeigte das Digestat nur eine schwache Aciditätszunahme.

TABELLE VII.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)			
Zeit	Hauptversuch	Kontrolle	Zunahme
Sofort	1,65	0,55	1,4
5 Tage	3,65	1,15	
Zweiter Zusatz			0,24
Sofort	4,17	1,83	
5 Tage	5,33	2,75	

Das Digestat behandelte man in der gleichen Weise wie im Versuch mit Leber-Katheptase und isolierte auch eine kristallinische Masse (0,325 g) aus Ätherextrakt, die nach dem Umkristallisieren

aus heissem Wasser bei 187°C schmolz.

Analyse: 22,5 mg Subst. 6,2 ccm 0,02 n-H₂SO₄ (Kjeldahl)

Ber. C₆H₉O₃N N 7,82%

Gef. N 7,71%

TABELLE VIII.

Benzoyldiglycinspaltung durch ereptasefreie Katheptase der Schweinemilz und Isolierung des Spaltungsproduktes.

Zur Isolierung des Spaltungsproduktes wurde der Ansatz mit 100 ccm 0,05 Mol-Benzoyldiglycinlösung und 1 g ereptasefreiem Milzpulver in 10 ccm Wasser bei P_H 4,5 unter Toluol digeriert.

Nach Ablauf der Digestion mit dem zweiten Enzymzusatz isolierte man das Abbauprodukt nach der angegebenen Prozedur (Ausbeute 0,275 g). Die kristallinische Substanz schmolz bei 187°C und die Probe mit der reinen Hippursäure zeigte keine Depression.

Analyse: 43,5 mg Subst. 11,75 ccm 0,02 n-H₂SO₄ (Kjeldahl)

Ber. C₆H₉O₃N N 7,82%

Gef. N 7,56%

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)			
Zeit	Hauptversuch	Kontrolle	Zunahme
Sofort	1,1	0,55	1,4
5 Tage	3,4	1,45	
Zweiter Zusatz			0,14
Sofort	3,47	1,67	
5 Tage	4,67	2,73	

LITERATUR.

- Chen, T., Hirooka, T. u. Kawaharada, M. (1940): Dieses Journ., **31**, 335.
 Hirooka, T. (1942): Tohoku Journ. exp. Med., **42**, 287.
 Utzino, S. u. Sakai, T. (1941): Dieses Journ., **33**, 457.
 Waldschmidt-Leitz, E. u. Deutsch, W. (1927): Zeits. f. physiol. Chem., **167**, 285.
 Waldschmidt-Leitz, E., Schöffner, A., Bek, J. J. u. Blum, E. (1930): ibidem, **188**, 17.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

LXXX. On Neutral Polysaccharides of Glycoproteins. A supplementary note of the LIX and LXVI informations.

By

HIROSI SUZUKI.

(From the Medico-Chemical Institute, Tohoku Imperial University,
Sendai. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, January 30, 1943)

Several polysaccharides from glycoproteins have recently been demonstrated by our collaborators* to consume much less amount of iodine (the method of Cajori and that of Macleod and Robison) than that calculated from their reducing power, when expressed in terms of glucose, on ferricyanide. They were the ones which possess most likely acetylhexosamine as such at the reducing end of the molecule. The amide-linkage of acetylhexosamine is quite stable against the alkalinity grades, that were chosen by the devisers of those iodine methods. Iodine consumed by the polysaccharides therefore denotes the number of aldehyde radicals in them as in ordinary sugars. On the contrary, the reduc-

* Dr. Osaki found that mucosin [LXX report (Osaki and Hasegawa) of this series of investigation] reduced ferricyanide to the extent of 5.21% of glucose in contradistinction to its iodine consumption (Cajori method) which amounted to only 2.38% of glucose and that chondroitinsulfuric acid (LXIX report by Masamune and Osaki) reduced ferricyanide and iodine to the extents of 12.18 and 1.74% of glucose respectively.

Moreover, according to Dr. Asagi, blood group A substance from pig gastric mucus [Sp. 2. LXIII report by Kobayasi (1941, ii)] can reduce only 6.1% of iodine that glucose does (Macleod and Robison method), whereas its reducing power on ferricyanide was seen by Dr. Kobayasi to correspond to 10.5% of that of glucose. The molecular weight of this substance might be assumed to be close to 3000, about double the value obtained by the latter author (1941, i).

Masamune.

tion power of ferricyanide depends generally on the structure of carbohydrates (cf. f. i. Masamune and Tanabe).

With regard to the carbohydrates of ovo- and sero-mucoid, which are polysaccharides resembling those above in the terminal constitution of molecule, the writer measured firstly (1941, i and ii) their ferricyanide-reducing force for the estimate of the molecular weight, due to the shortage of material. To check the possibly erroneous values thereby given, the attempt has been repeated in this report.

New specimens were prepared for the present experiment. They contained hexose and N in quantities similar to those of the former preparatins. Quite unexpectedly, however, the iodine consumption amounted to 0.093 aldehyde equivalent in the ovomucoid-polysaccharide and to 0.11 aldehyde equivalent in the seromucoid-polysaccharide, both expressed as glucose. The figures are nearly in accord with the extents of ferricyanide reduction by these carbohydrates (9.0–11.7% and 12% respectively of glucose). In other words, the molecular weights already reported are considered tenable.

EXPERIMENTAL.

Preparations of the Carbohydrates of Ovo- and Serum-mucoid.

The procedures were the same as previously employed. The preparation of ovomucoid contained 39.5% mannose (iodole method) and 4.2% N and the one from seromucoid 54.7% hexose (as an equivalent mixture of galactose and mannose; indole method) and 3.2% N.

Iodine Consumption of Acetylglucosamine and the Carbohydrates from the Mucoids (the Macleod and Robison method).*

* To 3 cc. of a carbohydrate solution in a flask were added 3 cc. of 0.02 n. iodine solution and 0.2 cc. of 5% Na_2CO_3 solution in turn. The flask was stoppered and immersed quickly in a water bath at 21°C (dark room) and acidified after 30 minutes with 0.5 n. H_2SO_4 . The titration was made with 0.005 n. sodium thiosulfate solution. In this way accurate values are given only within the quantities of carbohydrate which reduce 0.55–1 cc. of the iodine solution.

1. Acetylglucosamine.

It used iodine amounting to 1.02 aldehyde equivalents.

2. Ovomucoid-carbohydrate.

Substance	<i>n</i> /50 iodine used
14.4 mgms.	0.77 cc.

This amount of iodine corresponds to 9.3% of that reduced by glucose.

3. Seromucoid-carbohydrate.

Substance	<i>n</i> /50 iodine used
9.0 mgms.	0.60 cc.

The iodine quantity used amounts to 11% of that reduced by glucose.

The expenses of this work were defrayed by a grant from the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan and that bestowed by the Grant Committee for Scientific Researches of the Education Department.

REFERENCES.

- Cajori (1922): *J. biol. Chem.* **54**, 617.
 Kobayasi, Tadasi (1941, i): *J. Bioch.* **33**, 369.
 " " (1941, ii): *J. Bioch.* **34**, 143.
 Macleod and Robison (1929): *Bioch. J.* **23**, 517.
 Masamune and Osaki, S.-I. (1943): *Tohoku J. exp. Med.* **45**, 121.
 " and Tanabe (1938): *J. Bioch.* **28**, 19.
 Osaki, S.-I. and Hasegawa (1943): *Tohoku J. exp. Med.* **45**, 176.
 Suzuki, H. (1941, i): *J. Bioch.* **33**, 219.
 " (1941, ii): *J. Bioch.* **34**, 167.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

LXXXI. Chondrosin.

Third Report: On so-called Chondridin.

By

TETU KOBAYASI.

(From the Medico-Chemical Institute, Tohoku Imperial University,
Sendai. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication January 30, 1943)

According to Hebting, who isolated "chondridin" for the first time, this compound has the composition $C_{12}H_{23}NO_{12}$, involving one more molecule of water than chondrosin of Schmiedeberg.¹⁾ It was obtained in a crystalline form and had a strong reducing power. For these reasons, he gave it the special name mentioned to distinguish it from chondrosin. Later on, Levene and López-Suárez claimed chondridin to be a lactone of chondrosin, because of its content of crystalline water, an elementary composition, a furfural yield and the result of alkaline titration.

Following remarks might be made on the descriptions of the authors:—

(1) Levene and López-Suárez's theory of chondrosin lactone structure of chondridin conflicts with the finding of Hebting that the watery solution of this substance showed a faint acid reaction, which has also been demonstrated by us. Levene and López-Suárez used alizarine as an indicator for the titration and stated to have found an increase of acidity, which corresponds to

1) Schmiedeberg isolated non-crystalline chondrosin sulfate and calculated the composition of chondrosin from the analytical figures of this salt. Other salts of chondrosin hitherto prepared (hydrochloride Levene and La Forge, oxalate Hebting) were also amorphous. What is more, no one has ever tried to isolate chondrosin in the solid form from its salt which had been once separated.

the opening of their alleged lactone ring, when they stood a chondridin solution with an excess of alkali. However, alizarine colour changes very gradually in neutralization of a chondridin solution and is consequently considered inadequate for this purpose.

(2) Hebling said that chondrosinethylester-hydrochloride is obtainable from chondridin. But notwithstanding that he gave the ultimate analytical results and the optical rotatory power of the ester hydrochloride obtained from crude chondrosin oxalate, he brought forward no proof for the identity of this and the derivative from chondridin. Probably the figures of the chondridin product were similar so that he deemed superfluous to give a detail. Nevertheless, of the isometric composition are the ester of chondrosin which is glucuronidochondrosamine (cf. Masamune, Hiyama and Kobayasi) and that of chondrosaminidoglucuronic acid, and moreover, he overlooked the occurrence of mutarotation in the optical measurement (cf. Masamune and Hisamura). Judging from the formula of chondroitin of Masamune and Osaki, acid hydrolysis is possible from this polysaccharide to produce simultaneously both the isomeric disacharides.

(3) The furfural yield and an elementary composition of chondridin, which Levene and López-Suárez determined, also can hardly be decisive evidences for their assertion that it is a chondrosin derivative.

After these considerations, we again took up the study of the chemical structure of chondridin. Chondridin was prepared according to Hebling. It lost no weight in vacuo at an elevated temperature, contrary to the statement of Levene and López-Suárez. A quantitative analysis of a total and amino nitrogen, and several qualitative tests indicated that it is free chondrosin or the isomer of chondrosin mentioned or an anhydride of either of them with one molecule of very firmly bound crystalline water. So we adapted, firstly, the formol titration process to the preparation. But, even standing for a long time with an excess of alkali did not increase its acidity and the neutral equivalent moreover coincided with the molecular weight of chondrosin. The proof for its non-lactone nature has thus been established. In order to deter-

mine the remaining problem, we oxidized it by taking an advantage of mercuric oxide. One of the products was cinchonidine salt of glucuronido-tagaturonic acid (cf. Kobayasi, the fourth report) as had been obtained from chondrosin oxalate. For the glucuronide structure were furnished further arguments by its reducing force on iodine (Cajori method) as well as by the positive Ehrlich reaction which it gave after being heated with alkaline acetylacetone solution. It may be put forward that chondridin is nothing but chondrosin free from the acid used for hydrolysis of chondroitin-sulfuric acid. We could also separate so-called chondridin from chondrosin oxalate by dissolving the latter in water and to this solution using the method by which Hebling prepared it from the hydrolyte of chondroitinsulfuric acid. By the repetition of the processes, chondrosin oxalate remaining as such was reduced to a trace, although the total yield of chondridin was less than the theoretical.

EXPERIMENTAL.

Preparation of Chondridin and its Properties.

Chondridin was prepared according to Hebling. The crystalline product was free from ash and not hygroscopic and began to become brown at 125°C, decomposing at 185–190°C. It dissolved in 100 times the weight of cold water and showed faint acid reaction (pH 5.8). It was slightly soluble in 95% alcohol but insoluble in absolute alcohol and ether. Hot Fehling's solution was reduced intensively. Ammoniacal silver nitrate solution (the Tollens reagent) was reduced moderately in the cold and strongly on heating. The Lassaigue test for nitrogen and both naphthoresorcinol test and the Molisch test for hexuronic acid were positive. Furfural was produced by boiling it with concentrated hydrochloric acid (aniline acetate test).

From what Levene and López-Suárez recorded, $2\frac{1}{2}$ molecules of crystalline water are removed from chondridin at the temperature of water vapour under a diminished pressure. But a similar treatment (100–110°C, under vacuum) could not cause any loss of weight of our product.

Amino nitrogen (Van Slyke method).

7.146 mgms. substance, 0.51 cc. (755 mm., 11°C) N₂.

C ₁₂ H ₂₁ NO ₁₁ :	Calc.	3.94%
	Found	4.21%

Total nitrogen (the Dumas micro method).

3.3195 mgms. substance, 0.117 cc. (758 mm., 23.5°C) N₂.

C ₁₂ H ₂₁ NO ₁₁ :	Calc.	3.94%
	Found	4.05%

Optical rotatory power¹⁾ in water.

At the 25th minute after dissolution

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{0.39 \times 2.9944}{0.0214 \times 1.0049 \times 1} = +52.26^\circ,$$

and at equilibrium

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{0.37 \times 2.9944}{0.0214 \times 1.0049 \times 1} = +49.38^\circ.$$

Titration of the Substance with Alkali.

This was carried out not only with but also without a simultaneous use of formalin. As an indicator, phenolphthalein was used.

(1) With formalin.

24.160 mgms. of chondridin were dissolved in 25 cc. of re-distilled water and 30 cc. of formalin, which had been neutralized with 0.05*n*. NaOH to phenolphthalein, were added and titrated thereupon. A blank run was made in parallel for control. 1.217 cc. of the NaOH solution were needed.

Molecular weight,

C ₁₂ H ₂₁ NO ₂ :	Calc.	355
	Found	367 ²⁾

10 cc. of 0.05*n*. NaOH were then added and the solution was left standing for 18 hours (the flask containing the solution was

1) Hebling: $[\alpha]_D^{20} = 41^\circ$. Levene and López-Suárez:
 $[\alpha]_D^{20} = +60.6^\circ$.

2) $0.02416 \times 1000 / 1.317 \times 0.05$.

stoppered; room temperature, 17–19°C) and titrated back with 0.05 *n.* HCl. The required quantity of the HCl solution did not differ from the corresponding quantity in the control. In the vessel was suspended a small tube, containing the Nessler reagent, but no liberation of ammonia could be detected. Another alkaline solution was stood also for a longer duration of time, but the results were the same.

As further control experiments, glucosamine- and chondrosaminehydrochloride were subjected to a similar operation. In this case, alkaline consumption was always in accord with the calculation from hydrochloric acid bound with the amino-sugars. It is plausibly assumed that acid formation from the amino-sugars by oxidation of the aldehyde group or by the molecular fission, either due to the contact with alkali, did not take place. Ammonia was also not liberated.

(2) Without formalin.

19.265 mgms. of chondridin were dissolved in 25 cc. of re-distilled water and titrated with 0.05 *n.* NaOH. 0.734 cc. of the alkali was used. Then 10 cc. of the alkali were added and stood for 18 hours (a stoppered flask, 17–19°C). This time only 9.005 cc. of 0.05 *n.* HCl were necessary to titrate the solution to a neutral point. Addition of a 10 cc. portion of the alkali and standing were repeated, but the back titration was completed each time with the HCl solution less in quantity than the equivalent to the added alkali. A yellow precipitate appeared from the Nessler reagent in the tube set up as in (1). The control was run with water in place of the chondridin solution. These results appear to suggest that disintegration of chondridin occurred in the experiment of Levene and López-Suárez.

Oxidation of Chondridin by means of Mercuric Oxide.

500 mgms. of chondridin were treated with mercuric oxide as in the case of chondrosin oxalate (Masamune, Hiyama and Kobayasi). The fraction of Lassaigue-negative acids (as barium salts), which were produced, amounted to 280 mgms. after reprecipitation. It gave naphthoresorcinol test for hexuronic acid

and reduced Fehling solution, but did not consume iodine under the Cajori condition. 230 mgms. of it were used for changing into cinchonidine salts and 130 mgms. of crystals in plate form, after second purification, and 45 mgms. of those in needle form were yielded.

The former of the cinchonidine salts melted at 189–190°C and showed no depression of the melting point when mixed with the corresponding salt from chondrosin oxalate. 4.605 mgms. of the substance lost 0.890 mgms. on drying constant at 100–110°C in vacuo.



Calc. 19.66% H_2O

Found 19.33% H_2O

Analysis of N (the Dumas micro method):

3.477 mgms. substance, 0.138 cc. (758 mm., 15°C) N_2 .



Calc. 4.70% N

Found 4.69% N

$[\alpha]_D^{10}$ was -83.96° $\left(= \frac{-0.675 \times 3.3753}{0.0270 \times 1.0043 \times 1} \right)$, which coincides

with the power of the corresponding product from chondrosin oxalate ($[\alpha]_D^{15} = -84.15^\circ$).

Iodine Reduction of Chondridin.

Cajori method was employed to determine iodine reduction of chondridin.

substance (mgm.)	0.1 n. iodine reduced, as aldehyde equivalent of chondridin ($\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_{11}$) (cc.)
10.08	2.95
9.30	2.95

The iodine figures nearly agree with that¹⁾ of chondrosin-ethylster hydrochloride as expressed in aldehyde equivalent.

1) 2.60 (Masamune, Hiyama and Kobayasi).

Ehrlich Reaction of Chondridin.

Hamasato and Akakura method was used, but the substance was dissolved in 12.86% saline solution and heated with the acetylacetone solution, thus eliminating preliminary hydrolysis. The reaction mixture developed a red colour with the dimethylaminobenzaldehyde solution.

We were enabled to perform this work by a grant from the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan and that given by the Grant Committee for Scientific Researches of the Education Department.

REFERENCES.

- Cajori, F. A. (1922): J. biol. Chem., **54**, 617.
 Hamasato, Y. and Akakura, K. (1941): J. Bioch., **34**, 159.
 Hebling, J. (1914): Bioch. Z., **63**, 353.
 Kobayasi, Tetu: Tohoku J. exp. Med., in press.
 Levene, P. A. and La Forge, F. B. (1913): J. biol. Chem., **15**, 69.
 Levene, P. A. and López-Suárez, J. (1920): J. biol. Chem., **45**, 467.
 Masamune, H. and Hisamura, H. (1938): J. Bioch., **28**, 137.
 Masamune, H., Hiyama, N. and Kobayasi, Tetu (1942): Tohoku J. exp. Med., **44**, 33.
 Masamune, H. and Osaki, S.-I. (1943): Tohoku J. exp. Med., **45**, 121.
 Schmiedeberg, O. (1891): Arch. exp. Pathol. u. Pharmacol., **28**, 355.

STUDIEN ÜBER DAS ENDOTOXIN VON SALMONELLA TYPHI.

I. Mitteilung: Die Isolierung der antigenen und hoch toxischen Substanz aus *Salmonella typhi*.

VON

YOSHIHARU TAKEDA, TATUO OHTA UND
MINORU SATO.

(Aus dem Bakteriologischen Institut der Universität Taihoku.
Direktor: Prof. Y. Takeda.)

(Eingegangen am 30. Januar 1943)

Wie schon früher erwähnt wurde, haben Takeda und Ohta¹⁾ eine selbst ausgearbeitete Isolierungsmethode der Acetylpolysaccharide an grampositiven Tuberkelbazillen angewandt und in ihrer Darstellung guten Erfolg erzielt. Wir haben daher in gleicher Absicht zur Gewinnung der Acetylpolysaccharide die gramnegativen *Salmonella typhi* nach derselben Methode behandelt.

Aber entgegen unserer Erwartung erwiesen sich die gewonnenen Polysaccharide nach chemischer Analyse als Komplex-Polysaccharide und bei der Einverleibung in Tiere als Vollantigen und zugleich als starke toxische Substanz. Während die Acetylpolysaccharide der Tuberkelbazillen und Tuberkulin, wie schon berichtet,¹⁾ als Hapten gewonnen wurde und atoxisch gegen normale Tiere waren.

Zur Darstellung dieser Substanz aus *Salmonella typhi*, wie aus Tabelle I ersichtlich, wurden die Keime in grosser Menge mit 0,3% iger Essigsäurelösung bei Zimmertemperatur extrahiert: dabei wurde das beigemischte Protein mit Bleicherde an PH 4,6 adsorbiert, während das Endotoxin in den Extrakt zurückblieb und daraus nach Neutralisierung mit Natronlauge mittels Alkohol gefällt werden konnte.

Das mit Alkohol gefällte Roh toxin wurde zur Entfernung der Begleistoße einmal mit Eisessig umgefällt und das relativ gerei-

TABELLE I.

Feuchte Bakterien (628 g)			
Mit 0,3%iger Essigsäurelösung 2mal geschüttelt, extrahiert.			
Extrakt			
Begleitstoffe adsorbiert mit Bleicherde an PH 4,6 (mit Phosphorsäure)			
Überstehende Flüssigkeit			
Mit Natronlauge neutralisiert, konzentriert, mit Alkohol gefällt.			
Niederschlag			
In Wasser gelöst und filtriert und durch Berkefeldfilter filtriert.			
Konzentriertes Filtrat			
mit Alkohol gefällt.			
Niederschlag			
In Wasser gelöst und einmal mit Eisessig gefällt.		In Wasser gelöst und dreimal mit Eisessig gefällt.	
Niederschlag (Toxin. Nr. 18)		Niederschlag (Toxin. Nr. 19)	
Elementaranalyse		Elementaranalyse	
C%42,00, H%6,47, Asche%10,34, N%1,07		C%42,20, H%6,78, Asche%10,16, N%0,60	
Biuretreaktion: negativ		Biuretreaktion: negativ	
Molischreaktion: positiv		Molischreaktion: positiv	
Minimale lethale Dosis gegen Mäuse: 0,10–0,15 mg.		Minimale lethale Dosis gegen Mäuse: 0,02–0,03 mg.	
Antigenität in vivo: positiv 330 mg Toxin		Antigenität in vivo: positiv 330 mg Toxin	
Durch 0,2 n-Essigsäure hydrolysiert		Mit 5% H ₂ SO ₄ hydrolysiert	
Amorphe Substanz	Polysaccharid	Amorphe Substanz	Monosaccharide
15 mg (4,5%)	N% 0,86	38 mg (11,5%)	Osazone
Biuretreaktion: negativ	Toxität: keine	Biuretreaktion: negativ	Glucose (Fp 207°)
Ninhydrinreaktion: negativ	Antigenität in vivo: keine	Molische Reaktion: negativ	Methylpentose (Fp 182°)
Molische Reaktion: negativ	Präzipitation: in 1/100,000 positiv		

nigte Toxin (Nr. 18) noch zweimal mit Eisessig gereinigt (Nr. 19). Die chemischen und biologischen Eigenschaften dieser beiden Toxine wurden in Tabelle II zusammengestellt und miteinander verglichen.

TABELLE II.

Toxin	$[\alpha]_D$	N%	P% (organisch)	P% (anorganisch)	Asche	Giftigkeit gegen Mäuse	Antigenität
Nr. 18	—	1,07	1,26	1,07	10,34	0,1–0,15mg	Vollantigen
Nr. 19	+83,7°	0,60	0,81	0,46	10,16	0,02–0,03mg	Vollantigen

Die beiden gereinigten Toxine wurden als weisses, amorphes hygroskopisches Pulver gewonnen, wobei das Toxin (Nr. 18) 1,07% Stickstoff und 2,33% Phosphor und 10,34% Asche enthielt, während bei dem Toxin (Nr. 19) der Gehalt dieser Substanzen geringer war und die folgenden Werte ergab: N 0,60%, P 1,27% und Asche 10,16%.

Bei beiden Toxinen fielen die Biuret- und Ninhydrinreaktion mit 10%iger Lösung negativ, dagegen die Molische Reaktion stark positiv aus.

Das Toxin (Nr. 19) dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts, wobei die spezifische Drehung für Polysaccharid +83,7° beträgt.

Die beiden Toxine haben, wie aus Tabelle III ersichtlich, die Eigenschaft bei intravenöser Einverleibung Antikörper, Agglutinin und Präzipitin, zu produzieren, besonders das Präzipitin wurde bei Injektion von ca. 5 mg Toxin (Nr. 18) und ca. 8,5 mg Toxin (Nr. 19) in dem Intervall von zwei Monaten und zwei Wochen in hohem Grade gebildet: dabei war die Präzipitationsreaktion in hoher Verdünnung 1/500000, 1/400000 positiv.

Den Reinheitsgrad beider Toxine ergibt der Tierversuch, deren Giftigkeit wurde durch Reinigung mit Eisessig gesteigert und deren Giftmessung gegen Mäuse an einer grossen Anzahl von Tieren

TABELLE III.
Antigenität des Toxin in vivo.

Nr. d. Tiere			9	10	11	26	27
Nr. d. Toxin			18	18	19	19	19
Gesammte Menge des injektierten Toxin			5,0 mg	5,0 mg	2,6 mg	8,5 mg	7,0 mg
Dauer d. Immunisierung (Tage)			54	54	58	12	16
Zahl der Injektionen			10	10	18	5	5
Agglutinations-titer			1/6400	1/3200	—	—	—
Präzipitations-titer	Antigen	Toxin Nr. 18	1/500000	1/20000	1/50000	1/400000	1/200000
		Toxin Nr. 19	—	—	1/100000	1/400000	1/200000

vorgenommen. Es wurde festgestellt, dass 0,1 mg bis 0,15 mg Toxin (Nr. 18) und 0,02 mg bis 0,03 mg Toxin (Nr. 19) genügen, um eine 9–11 g schwere Maus durchschnittlich innerhalb von 24 bisweilen 48 Stunden zu töten.

In neutraler, wässriger Lösung können die beiden Toxine kurze Zeit ohne Veränderung auf 100° erhitzt werden. Sie zerfallen im schwach saueren Milieu (0,2 n-Essigsäurelösung) unter Verlust der biologischen Wirkung in Polysaccharid und andere Substanz.

330 mg Toxin (Nr. 18) wurde hydrolysiert und dabei fanden sich folgende Substanzen: 15 mg amorphe Substanz wurde ausgeschieden, deren Biuretreaktion negativ ausfiel. Nach Abscheidung dieser amorphen Substanz wurde das Polysaccharid von der hydrolysierten Lösung mit Alkohol gefällt, das noch 0,8%igen Stickstoff enthielt, aber die toxische und vollantigene Eigenschaft eingebüßt hatte und Hapten geworden war. Die Präzipitationsreaktion dieser Substanz mit homogenem Antiserum erwies sich positiv in einer Verdünnung von 1/1000000. 33 mg Toxin (Nr. 19) wurde in gleicher Weise hydrolysiert und die Abscheidung der amorphen Substanz beobachtet.

Seit der Veröffentlichung von Boivin und seinen Mitarbeitern²⁾ sind die Toxine der *Salmonella* und Dysenterie-Gruppe von mehreren Autoren (Hosoya und Kawashima,³⁾ Kobayashi,⁴⁾ Morgan und Partridge,⁵⁾ Mayeda,⁶⁾ Ikawa⁷⁾), unter anderem Raistrick und Topley⁸⁾ erforscht worden. Eine Übereinstimmung dieser Autoren liegt darin vor, dass das Endotoxin dieser Gruppe der Bakterien in der Polysaccharid-Fraktion gefunden wurde. Kuroya und seine Mitarbeiter⁹⁾ haben zwei Fraktionen, die Proteinfraktion (PF nach Ihnen) und die Kohlenhydratfraktion (CF nach Ihnen), aus Typhusbazillen isoliert und berichtet, dass CF viel toxischer als PF sei.

Bei der Darstellungsmethode wurde das Lösungsmittel besonders berücksichtigt, um den Eintritt der Proteine in den Extrakt möglichst zu vermeiden. Boivin²⁾ nahm daher die Extrahierung mit $n/4$ Trichloressigsäure und Morgan¹⁰⁾ nahm sie mit Diäthylenglykol vor. Raistrick und Topley⁸⁾ haben für denselben Zweck die Bakterienproteine durch Trypsinverdauung abgebaut.

Aus unseren Versuchsergebnissen wurde geschlossen, dass der wichtigste Punkt des Reinigungsverfahren des Toxin nicht in der Vorbehandlung des Bakterienleibes oder Auswahl der Lösungsmittel, sondern in der weiteren Reinigungsmethode des Rohtoxin liegt. Es ist uns gelungen, das Toxin mit 0,3% iger Essigsäure bei Zimmertemperatur zu extrahieren und das mittels Alkohol gefällte Rohtoxin durch mehrmaliges Umfällen mit Eisessig von den Begleitstoffen fast zu befreien.

Wenn wir als Kriterium des Reinheitsgrades der Endotoxinpräparate in deren Giftigkeit ansehen, so können wir sagen, dass unsere Präparate im Vergleich zu denen der genannten Autoren hochgradig gereinigt sind.

Die minimale lethale Toxindosis für Mäuse ist 0,1 mg (Typhustoxin nach Boivin²⁾) und 0,5 mg (Mäusetyphustoxin nach Raistrick und Topley⁸⁾) und 0,25 mg (Typhustoxin nach Henderson und Morgan¹¹⁾).

Durch die Beobachtung der hydrolytischen Spaltung gelangte Boivin zu der Ansicht, dass das Endotoxin der *Salmonella typhi* als Kohlenhydrat-Lipoid-Verbindung anzusehen ist. Und Morgan

und Partridge halten, gestützt auf die gleichen Beobachtungen, die Vorstellung von der komplexen Struktur des Toxins und haben das Endotoxin des *B. dysenteriae* Shiga als Kohlenhydrat-Phosphatid-Polypeptid-Verbindung angesehen.

Es fehlt aber der Beweis dafür, dass ihre Präparate chemisch einheitlich sind und dass der in den Präparaten enthaltene Stickstoff und Phosphor dem Molekül zugehörten.

Nach unseren Ergebnissen, wie aus Tabelle II ersichtlich, ist der Gehalt an Phosphor und Stickstoff mit der Befreiung der Begleitstoffe durch Umfällen mittels Eisessig vermindert, und der Gehalt in gereinigtem Toxin (Nr. 19) viel geringer als die genannten Autoren angeben. Daraus wäre zu schliessen, dass der Gehalt an diesen beiden Stoffen als Bestandteil des Toxinmoleküls viel geringer sein muss als die Angaben der genannten Autoren, unter Voraussetzung der Komplexstruktur des Toxin in ihrem Sinne.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Isolierung des Toxin.

Die feuchten Bakterien, 628 g, die auf Agarnährböden 24 Stunden lang bei 37° gezüchtet waren, wurden mit 2l 0,3%iger Essigsäure zweimal 25 Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt und extrahiert. Die stark getrübe Lösung wurde mit Natronlauge neutralisiert und mit Talk geschüttelt, um dann die Bakterien leicht abzentrifugieren zu können. Die überstehende getrübe Lösung wurde mit H_3PO_4 zu pH 4,6 gemacht, mit der Rührmaschine gut gerührt und bei 10° aufbewahrt, dann wurden 50 g Bleicherde zugegeben und das Umrühren noch 1 Stunde lang fortgesetzt. Die Lösung wurde dann abzentrifugiert und der Überstand mit Natronlauge neutralisiert und unter vermindertem Druck eingedampft. Der stark konzentrierten Lösung wurden 1500 ccm Alkohol zugegeben und der entstehende Niederschlag abzentrifugiert.

Der Niederschlag wurde mit 350 ccm Wasser gelöst, 1 Stunde lang auf dem Wasserbad erwärmt und mit Filtrierpapier filtriert. Die fast klare Lösung wurde im Cellophanschlauch gegen destilliertes Wasser 7 Tage lang dialysiert, dann unter vermindertem

Druck konzentriert und mit Berkefeldfilter filtriert, dann mit Alkohol niedergeschlagen. Die Ausbeute beträgt 12,5 g grauweissliches Pulver.

Dieses Pulver wurde in 50 ccm Wasser gelöst, mit 750 ccm Eisessig versetzt und nach dem Stehen über Nacht abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit Alkohol zweimal gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute beträgt 3,1 g fast farbloses Pulver (Toxin Nr. 18).

Die chemischen Eigenschaften dieses Toxin (Nr. 18):

N-Gehalt: 1,07% nach Kjeldahl.

P-Gehalt: organisch 1,26% nach Fiske und Sabbarow.

anorganisch 1,07% „

Ninhydrinreaktion: negativ mit 0,1 ccm der 10%igen Lösung.

Biuretreaktion: negativ mit 0,1 ccm der 10%igen Lösung.

TABELLE IV.
Giftigkeit gegen Mäuse.

Injektionsmenge des Toxin.	Zahl der gestorbenen Tiere.
0,15 mg	3/3
0,10 mg	2/3

Dosis Lethalis Minima 0,10–0,15 mg.

Bemerkung:

3/3 bedeutet, dass drei Tiere mit Toxin injiziert wurden und wodurch alle drei Tiere gestorben sind usw. Das Körpergewicht der gebrauchten Mäuse betrug 9–11 g. Die Injektion erfolgte in die Schwanzvenen der Mäuse. Die Injektionsmenge der physiologischen Kochsalzlösung betrug 0,1 ccm, in welcher die in dieser Tabelle angegebene Menge des Toxin enthalten ist.

Weitere Reinigung des Toxin.

2,1 g Toxin (Nr. 18) wurde in 30 ccm Wasser gelöst und mit 500 ccm Eisessig gefällt. Der Niederschlag wurde mit Alkohol einmal gewaschen und nochmals in 30 ccm Wasser gelöst und mit

Eisessig gefällt. Der Niederschlag wurde einmal mit Alkohol gewaschen und in 300 ccm Wasser gelöst, mit Talk versetzt, gut geschüttelt und dann durch Glasfilter filtriert, die klare Lösung wurde dann unter vermindertem Druck konzentriert und mit 1 Liter Eisessig gefällt. Der Niederschlag wurde mit Eisessig gewaschen und dann mit Aceton und Äther gewaschen und nochmals in 50 ccm Wasser gelöst und mit Filterpapier filtriert und mit 1 Liter Aceton gefällt. Der entstehende Niederschlag wurde abzentrifugiert und im Vakuum getrocknet. 0.6 g weisses, lockeres, amorphes Pulver wurde gewonnen.

Die chemischen Eigenschaften des Toxin (Nr. 19):

N-Gehalt: 0,60% nach Kjeldahl.

P-Gehalt: organisch 0,81% nach Fiske und Sabbarow.

anorganisch 0,46% „

Biuretreaktion: negativ bei 1,0 ccm der 10%igen Lösung.

Ninhydrinreaktion: negativ bei 1,0 ccm der 10%igen Lösung.

Molische Reaktion: stark positiv „

Kein Niederschlag mit Bleiacetat, Bleiessig, Phosphorwolframsäurelösung (in neutraler und saurer Lösung).

Bestimmung des Drehungsvermögen. 35,8 mg Subst.: 50 ccm Wasser.

$$t=26^{\circ}, \quad l=2 \text{ dm} \quad \alpha=+0,12^{\circ}$$

$$[\alpha]_D^{26}=+83,7^{\circ}$$

TABELLE V.

Giftigkeit gegen Mäuse.

Injektionsmenge des Toxin.	Zahl der gestorbenen Tiere.
0,04 mg	3/3
0,03 mg	6/6
0,02 mg	2/4
0,01 mg	0/3

Dosis Lethalis Minima 0,02–0,03 mg.

Bemerkung:

Bemerkungen zu dem Experiment wurden in Tabelle IV gegeben.

Partielle Hydrolyse des Toxin (Nr. 18).

0,33 g Toxin (Nr. 18) wurde in 50 ccm der 0,2 *n*-Essigsäurelösung gelöst und auf dem Wasserbad von 95–100° erhitzt. Nach 1,5 Stunden trat schon eine amorphe Masse auf. Nach 2,5 stündiger Erhitzung wurde die Lösung im Eisschrank stehen gelassen. Der ausgeschiedene Niederschlag wurde abzentrifugiert und einmal mit 20 ccm Wasser und dann zum zweitenmal mit 10 ccm Wasser und zum drittenmal mit 5 ccm Wasser gewaschen und dann im Vakuum-Exsikkator getrocknet. Der getrocknete leicht bräunliche Niederschlag wiegt 15 mg und entspricht dem 4,5%igen Gewicht des Originaltoxin. Diese Substanz löst sich teilweise in verdünnter Alkalilauge und erwies sich bei der Biuret- und Molischreaktion negativ.

Die überstehende Lösung, die von dem Niederschlag abgetrennt wurde, ist opalescent, wurde mit dem Waschwasser zusammengebracht und mit 150 ccm Alkohol versetzt, um die Polysaccharide niederschlagen zu lassen, und abzentrifugiert.

Die niedergeschlagenen Polysaccharide wurden wieder in 10 ccm Wasser gelöst, mit 150 ccm Alkohol versetzt, wieder niederschlagen gelassen und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute ist 275 mg.

Die chemische Eigenschaften dieser Substanz.

N-Gehalt: 0,86% nach Kjeldahl.

TABELLE VI.
Giftigkeit gegen Mäuse.

Injektionsmenge des Toxin.	Zahl der gestorbenen Tiere.
0,5 mg	0/3
1,0 mg	0/3
2,0 mg	0/3

Biuretreaktion: negativ bei 1,0 ccm der 10%igen Lösung.

Molischreaktion: stark positiv

„

Bemerkung:

Bemerkungen zu dem Experiment wurden in Tabelle IV gegeben.

Diese Substanz ergab positive Präzipitationsreaktion mit homologem Immunserum in einer Verdünnung von mindestens 1/100000.

Antigenität in vivo:

Zwei Kaninchen (Nr. 29 und 30) wurden jedem für sich ca. 8,0 mg insgesamt dieser Substanz in Verlauf von 2 Wochen intravenös einverleibt, wobei eine nennenswerte Antikörperbildung bei beiden Tieren beobachtet wurde.

Hydrolytische Spaltung des Toxin (Nr. 19).

0,33 g Toxin (Nr. 19) wurde in 50 ccm 0,1n CH_3COOH gelöst und bei 100° eine Stunde lang erhitzt und dann in der Eiskammer aufbewahrt. Bei dieser Behandlung tritt kein Niederschlag auf.

Um die Hydrolyse weiter fortschreiten zu lassen, setzten wir H_2SO_4 bis zu 5% der Lösung zu, die dann 35 Minuten lang auf 100° erhitzt und nach 3 stündigen Stehenlassen abzentrifugiert wurde. Der erhaltene Niederschlag wurde zweimal mit 20 ccm Wasser gewaschen. Die Mutterlauge und die gewaschene Lösung wurden zusammengebracht und die Konzentration der H_2SO_4 bis zu 7% gesteigert und dann auf 100° erhitzt. Das Hydrolysat wurde durch Baryt quantitativ von H_2SO_4 befreit und die filtrierte Lösung zu Sirup eingeeengt. Ein kleiner Teil des Sirups wurde mit Wasser zu konzentrierter Lösung gebracht. Damit wurden folgende Reaktionen angestellt: Phloroglucinreaktion nach Wheeler und Tollens, Orcinreaktion, Acetonreaktion nach Rosenthaler und Seliwanoff-Weehuizense Reaktion mit Resorcin. Nur die Methylpentosereaktion war positiv und die anderen Reaktionen fielen negativ aus.

Der Sirup wurde zur Krystallisation der Galaktose mit 1,0 ccm Eisessig versetzt. Nach Stehen über Nacht schied sich kein Krystall aus. Es wurde daher verdampft, von Eisessig befreit und darauf

in kleinen Volumen 75%igem Alkohol gelöst und mit 0,3 g Benzylphenylhydrazin versetzt. Nach Stehen über Nacht wurde auch diesmal kein Krystall erhalten.

Die Lösung wurde mit 2 ccm Benzaldehyd gut geschüttelt, und das dabei gebildete Benzaldehyd-phenylhydrazon abfiltriert und die Lösung nochmals mit Äther geschüttelt. Der wässrige Teil, zu 3 ccm konzentriert und 0,4 g Phenylhydrazin versetzt (angesäuert mit Essigsäure) und 1 Stunde lang auf dem Wasserbad erhitzt, schied Krystall aus. Es wurde daher 15 ccm Wasser zugesetzt, auf 60°C erwärmt, mit Filterpapier filtriert und dieses Verfahren 6 mal wiederholt, dann wurden die in warmen Wasser unlöslichen Krystalle gesammelt und aus verdünnten Alkohol 2 mal umkrystallisiert. Die so erhaltenen hellgelben Nadeln schmolzen bei 207°C und zeigten keine Depression des Schmelzpunktes bei der Mischprobe mit Glucosazon.

Die Mutterlauge und Waschlösung wurden zusammengebracht und bis zur Trockenheit verdampft. Der Rückstand wurde mit kaltem Aceton fast völlig gelöst. Das Filtrat wurde verdampft und dabei entstehender krystallinischer Niederschlag aus verdünnten Alkohol umkrystallisiert. Es wurde gefunden, dass die hellgelben Krystalle bei 185°C schmolzen und sich starke Depression des Schmelzpunktes bei der Mischprobe mit reinem *l*-Rhamnose-phenylosazon zeigte.

0,2 g Toxin (Nr. 19) wurde in oben beschriebener Weise hydrolysiert, mit Phenylhydrazin behandelt und das abgeschiedene Osazon nach Löslichkeit in Aceton abgetrennt. Von dem acetonunlöslichen Teil wurde Glucosazon aus verdünnten Alkohol umkrystallisiert und vom in Aceton löslichen Teil wurden hellgelbe Krystalle von Fp. 182–3°C aus verdünnten Alkohol umkrystallisiert. Die in beiden Versuchen gewonnenen acetonlöslichen Krystalle wurden zusammengebracht und deren optische Drehung untersucht. Sie erwiesen sich als linksdrehend ($\alpha = -0,05 \sim 0,07^\circ$).

Die spezifische Drehung dieser Substanz konnte wegen unzureichender Substanzmenge nicht festgestellt werden, es handelt sich hier vielleicht um *d*-(–)Rhamnose-phenylosazon.

Diese Untersuchung wurde auf Kosten des General Gouverne-

ments Formosa zur Förderung wissenschaftlicher Studien durchgeführt, wofür wir unseren ergebensten Dank aussprechen.

LITERATUR.

- 1) Takeda und Ohta (1939): Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chem., **262**, 171.
- 2) Boivin und Mesrobianu: Revue d'Immunol., **1**, 553 (1935), **2**, 113 (1936), **3**, 319 (1937), **4**, 40, 197 und 469 (1938). C. r. Soc. Biol., **128**, 837 (1938).
- 3) Hosoya und Kuwashima (1936): Zikken Igaku, **20**, 913 (1936).
- 4) Kobayashi (1936): Japanese Journ. exper. Med., **14**, 285.
- 5) Morgan und Partridge (1940): Biochem. Journ., **34**, 169; Brit. Journ. exper. Path., **21**, 180.
- 6) Mayeda: Saikingaku Zassi, **1938**, 329, 340 und 351.
- 7) Ikawa: Saikingaku Zassi, **1937**, 534, **1938**, 245 und 740.
- 8) Raistrick und Topley (1934): Brit. Journ. exper. Path., **15**, 113; Lancet, **1937**, 232, 252.
- 9) Kuroya, Oshio und Pin (1940): Tohoku Journ. exper. Med., **38**, 167.
- 10) Morgan (1937): Biochem. Journ., **31**, 2003.
- 11) Henderson und Morgan (1938): Brit. Journ. exper. Path., **19**, 82.

STUDIEN ÜBER DAS ENDOTOXIN VON BACILLUS DYSENTERIAE SHIGA.

I. Mitteilung: Die Isolierung der toxischen und antigenen Substanz von *Bacillus dysenteriae* Shiga.

VON

YOSHIHARU TAKEDA, TATUO OHTA UND
YUSEN SEN.

(Aus dem Bakteriologischen Institut der Universität Taihoku.

• Direkter: Prof. Y. Takeda.)

(Eingegangen am 30. Januar 1943)

In der letzten Abhandlung haben Takeda, Ohta und Sato¹⁾ eine neue Isolierungsmethode des Endotoxin von *Salmonella typhi* berichtet. Es ist uns nun gelungen, das Endotoxin von *Bacillus dysenteriae* Shiga auch nach fast gleicher Methode zu isolieren.

Die Bakterien wurden in grosser Menge mit 0,3%iger Essigsäurelösung bei Zimmertemperatur extrahiert und dann wurde das begleitende Protein durch Adsorptionsverfahren mit Bleicherde an pH 4,6 von dem Extrakt getrennt, das sich nach Neutralisierung mit Natronlauge und das Endotoxin mittels Alkohol fällen lässt.

Das mit Alkohol gefällte Rohtoxin (Toxin Nr. 25) wurde zur weiteren Reinigung mit unserer Eisessigfällungsmethode zweimal umgefällt (Toxin Nr. 27).

Die Vergleichung der chemischen und biologischen Eigenschaften dieser beiden Toxin wurde in Tabelle I zusammengestellt.

Das Rohtoxin (Toxin Nr. 25) wurde als schwach bräunliches, amorphes, hygroskopisches Pulver und das gereinigte Toxin (Toxin Nr. 27) als grauweissliches, amorphes, hygroskopisches Pulver gewonnen.

Das Rohtoxin enthielt 3,00%igen Stickstoff und 1,44%igen organischen Phosphor, dagegen hatten die Werte dieser Substanzen des gereinigten Toxins (Toxin Nr. 27) abgenommen und ergaben

TABELLE I.

Autoren	Bazillen	Toxin	Eigenschaften der gewonnenen Toxine				Spaltprodukt des Toxins durch partielle Hydrolyse
			N%	Organisch	Anorganisch	P%	
Morgan und Partridge	Dysenterie (Shiga)		3,86	1,3			Amorphe Substanz
Kobayashi	Dysenterie (Komagome B III)		8,65	0			Polypeptid: 17-20% (N-Gehalt: 11%) Lipoid-Komponente: 9-12%
Mayeda	Dysenterie (Shiga)		3,66				
Takeda, Ohta und Sato	Typhus	Rohes (Toxin Nr. 18)	1,07	1,26	1,07		Amorphe Substanz: 4,5% (In Wasser schwer löslich. Biuret: negativ)
Takeda, Ohta und Sato	Typhus	Gereinigtes (Toxin Nr. 19)	0,60	0,81	0,46		
Takeda, Ohta und Sen	Dysenterie (Shiga)	Rohes (Toxin Nr. 25)	3,00	1,44	0,69		
Takeda, Ohta und Sen	Dysenterie (Shiga)	Gereinigtes (Toxin Nr. 27)	2,58	0,97	0,06		Polypeptidartige Substanz: 25% (Biuret: positiv N-Gehalt: 8,4%)
							50,9%
							83,3%

folgende Zahlen: N 2,58%, P(organisch) 0,97%, P(anorganisch) 0,06%.

Die beiden Toxine fielen bei der Biuretreaktion schwach positiv, dagegen bei der Molischreaktion stark positiv aus.

Die Giftigkeit der beiden Toxine gegen Mäuse wurde durch die Reinigung mit Eisessig gesteigert, 0,08 mg Rohtoxin (Toxin Nr. 25) und 0,015 mg gereinigtes Toxin (Toxin Nr. 27) genügen, um eine 9–11 g schwere Maus durchschnittlich im Ablauf von 24 bisweilen 48 Stunden zu töten.

Als noch andere biologische Eigenschaften haben die beiden Toxine die Antigenität *in vivo*, sie bildeten bei intravenöser Einverleibung Agglutinin und Präzipitin. Wie aus Tabelle II ersichtlich ist, wurde das Präzipitin in hohem Titer, 1/200000, 1/100000, entsprechend der Injektion von ca. 4,7 mg und 3,1 mg gereinigtem Toxin produziert.

TABELLE II.
Antigenität des Toxins in vivo.

Nr. d. Tiere	8	13	7
Nr. d. Toxins	27	27	27
Gesamt Menge des injektierten Toxins	4,7 mg	3,1 mg	3,15 mg
Dauer d. Immunisierung (Tage)	42	28	23
Zahl der Injektion	6	6	4
Agglutinationstiter	1/6400	1/3200	1/1600
Präzipitationstiter	1/200000	1/100000	1/100000

Die partielle Hydrolyse des gereinigten Toxins in schwach saurem Milieu (0,2-n Essigsäurelösung) wurde mit 0,33 g Toxin (Nr. 27) ausgeführt. Dabei zerfällt es unter Verlust von biologischer Wirkung und scheidet dabei 83 mg amorphe Substanz aus, die 25,1% des Toxins beträgt und mit Biuretreaktion positiv ausfiel; dessen Stickstoffgehalt beträgt 8,41% und löst sich in schwach alkalischem Milieu. Aus der hydrolysierten Lösung wurde das

Polysaccharid mit Alkohol gefällt, das noch 1,08%igen Stickstoff und 0,99%igen organischen Phosphor enthält. Die Biuretteaktion fiel negativ aus und es hatte die Eigenschaften des Toxin und Vollantigen eingebüsst und war an sich nur Hapten geworden. Die antigene Wirkung dieser Substanz in vitro mit homogenem Antiserum war positiv bei der Präzipitationsreaktion in einer Verdünnung von 1/50000. In Tabelle I ist der zusammenfassende Vergleich unserer Versuchsergebnisse mit denen einiger Autoren, z. B. Morgan und Partridge²⁾, Kobayashi³⁾, Mayeda⁴⁾ angeführt. Es wurde daraus folgendes erkannt: Unser Präparat des Toxin ist stark gereinigt und hoch toxisch, sein Gehalt an Stickstoff und Phosphor ist viel geringer als die anderen Autoren angeben.

Durch die Ergebnisse unserer chemischen Analyse und hydrolytischen Spaltung wird die Ansicht von komplexen Struktur dieses Toxins gestützt.

Ausserdem ist als höchst wahrscheinlich zu vermuten, dass eine polypeptidartige Substanz als ein Radikal des Toxins sich dem stickstoffhaltigen Polysaccharid, das an sich ungiftig ist, angelagert hat, da das gereinigte Toxin bei der Biuretteaktion vor der hydrolytischen Spaltung positiv ausfällt, dagegen hat es nach der partiellen Hydrolyse diesen Charakter verloren. Dabei enthält es als Folge der ausgeschiedenen Substanz Stickstoff in ziemlich hohem Prozentsatz (8,4%), zeigt gleichzeitig positive Biuretteaktion und beträgt 25% des Toxins.

In dieser Hinsicht verhält sich das Endotoxin der Typhusbazillen anderes, wie wir schon berichtet haben,¹⁾ so dass die Verbindung des Polypeptid mit Polysaccharid in dem Toxinmolekül schwer anzunehmen ist.

Über die Frage, ob der im gereinigten Toxin noch enthaltene Phosphor in der Form von Kohlenhydrat-Phosphatid-Komplex dem Molekül des Toxin zugehört, wie Morgan und Partridge²⁾ berichtet haben, oder als Verunreinigung noch anhaftet, soll in einem anderem Abschnitt erörtert werden.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Isolierung des Toxin.

670 g feuchte Bakterien, die auf Agarnährböden 24 Stunden lang bei 37° gezüchtet waren, wurden mit 2 l 0,3%iger Essigsäurelösung dreimal 25 Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt und extrahiert. Die stark getrübbte Lösung wurde mit Natronlauge neutralisiert, abzentrifugiert, die überstehende Lösung mit Phosphorsäure zu pH 4,6 gemacht, mit der Rührmaschine gut gerührt und bei 10° aufbewahrt. Nach Zugabe von 50 g Talk wurde das Umrühren noch 1 Stunde lang fortgesetzt.

Die Lösung wurde abzentrifugiert, die überstehende Lösung mit Natronlauge neutralisiert und unter vermindertem Druck abgedampft. Die konzentrierte Lösung wurde in Cellophanschläuchen gegen Wasser 5 Tage lang dialysiert, mit Berkefeldfilter filtriert, dann noch einmal gegen destilliertes Wasser 7 Tage dialysiert, zu 100 ccm in Vakuum konzentriert, mit Filtrierpapier filtriert, und dann mit 2 l Alkohol niedergeschlagen. Die Ausbeute beträgt 3,5 g schwach bräunliches Pulver (Toxin Nr. 25).

Analyse:

N-Gehalt (nach Kjeldahl) 3,00%.

P-Gehalt (nach Fiske u. Sabbarow) 1,44% (organisch).
0,69% (anorganisch).

TABELLE III.

Giftigkeit gegen Mäuse.

Injektionsmenge des Toxin.	Zahl der gestorbenen Tiere.
0,04 mg	0/3
0,08 mg	3/3
0,15 mg	3/3

Dosis Lethalis Minima: 0,08 mg.

Bemerkung:

3/3 bedeutet, dass drei Tieren Toxin injiziert wurde und dass alle drei Tiere daran gestorben sind und desgl. Das Körper-

gewicht der verwendeten Mäuse betrug 9–11 g. Die Injektion erfolgte in die Schwanzvenen der Mäuse. Die Injektionsmenge der physiologischen Kochsalzlösung betrug 0,1 ccm, in welcher die in dieser Tabelle angegebene Menge des Toxins enthält ist.

Weitere Reinigung des Rohtoxins.

3,3 g Toxin (Nr. 25) wurde in 20 ccm Wasser gelöst der ungelöste Teil mit Filtrierpapier abfiltriert und das Filtrat mit 500 ccm Eisessig niedergeschlagen. Die Ausbeute beträgt 1,2 g. Dieses getrocknete Pulver wurde in Wasser gelöst, dann mit Asbestfilter nach Seitz filtriert und das Filtrat auf 3 ccm konzentriert. Darauf wurde es mit 100 ccm Eisessig versetzt, der Niederschlag abzentrifugiert, mit Alkohol und dann mit Äther gewaschen und im Vakuum-Exsikkator getrocknet. Die Ausbeute beträgt 0,8 g. Dieses Pulver ist fast weisslich (Toxin Nr. 27).

Analyse:

N-Gehalt (nach Kjeldahl) 2,58%.

P-Gehalt (nach Fiske u. Sabbarow) 0,97% (organisch).

0,06% (anorganisch).

TABELLE IV.

Giftigkeit gegen Mäuse.

Injektionsmenge des Toxins.	Zahl der gestorbenen Tiere.
0,01 mg	0/3
0,015 mg	3/3
0,02 mg	3/3

Dosis Lethalis Minima: 0,015 mg.

Bemerkung:

Bemerkungen zu dem Experiment wurden in Tabelle III gegeben.

Antigenität in vitro:

Diese Substanz ergab positive Präzipitationsreaktion mit homologem Immunsrum in einer Verdünnung mindestens 1/500000.

Partielle Hydrolyse des Toxins.

0,33 g hochgereinigtes Toxin wurde in 50 cem der 0,2-*n* Essigsäure gelöst und im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach 10 Minuten Erhitzung begann eine amorphe Substanz aufzutreten; aber die Erhitzung wurde noch 2 Stunden lang fortgesetzt und die hydrolysierte Lösung über Nacht im Eisschrank stehen gelassen. Der ausgeschiedene Niederschlag wurde abzentrifugiert und mit 10 cem kaltem Wasser 3 mal gewaschen und im Vakuum-Exsikkator getrocknet. Das getrocknete schwärzliche Pulver wiegt 0,083 g und entspricht 25,1% des Gewichtes des Originaltoxins. Diese Substanz löste sich fast in verdünnter Natronlauge. Die Biuret Farbreaktion fiel positiv aus, wobei 5 mg Substanz in 2 cem der verdünnten Natronlauge gelöst wurden. N-Gehalt dieser Substanz beträgt 8,4% nach Kjeldahl.

Die überstehende Lösung, die von dem Niederschlag durch Abzentrifugieren abgetrennt wurde, ist opalescent, wurde im Vakuum auf 6 cem konzentriert, mit 180 cem Alkohol (96%) versetzt und eine Nacht stehen gelassen.

Die niedergeschlagenen Polysaccharide wurde abzentrifugiert und im Vakuum-Exsikkator getrocknet und als weissliches Pulver gewonnen. Die Ausbeute beträgt 0,168 g und entspricht 50,9% des Gewicht des Originaltoxins.

Analyse:

N-Gehalt (nach Kjeldahl) 1,08%.

P-Gehalt (nach Fiske u. Sabbarow) 0,99% (organisch).

0,03% (anorganisch).

TABELLE V.
Giftigkeit gegen Mäuse.

Injektionsmenge des Toxins.	Zahl der gestorbenen Tiere.
0,5 mg	0/3
1,0 mg	0/3

Bemerkung:

Bemerkungen zu dem Experiment wurden in Tabelle III

gegeben.

Antigenität in vitro:

Diese Substanz ergab positive Präzipitationsreaktion mit homologem Immunsérum in einer Verdünnung von mindestens 1/50000.

Antigenität in vivo:

Zwei Kaninchen (Nr. 31 und 32) wurden jedem für sich ca. 2,5 und 3,5 mg insgesamt dieser Substanz in Ablauf von 3 Wochen intravenös einverleibt, bei beiden Tieren wurde keine Antikörperbildung beobachtet.

Diese Untersuchung wurde auf Kosten des General Governments von Formosa zur Förderung wissenschaftlicher Studien durchgeführt, wofür wir unseren ergebensten Dank aussprechen.

LITERATUR.

- 1) Takeda, Ohta und Sato (1943): Diese Ztschr. 407.
- 2) Morgan und Partridge (1940): Biochem. Journ. **34**, 169; Brit. Journ. exper. Path., **21**, 180.
- 3) Kobayashi (1936): Japanese Journ. exper. Med., **14**, 285.
- 4) Mayeda: Saikingaku Zassi, **1938**, 329.

ÜBER DIE GEWEBEPROTEOLYSE.

III. Mitteilung: Über die katheptische Peptonspaltung.

VON

TOORU SAKAI.

*(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Fakultät der
Kaiserlichen Tohoku-Universität (Sendai) und aus dem Utzino-
Laboratorium des Instituts für Chemische Forschung
an der Kaiserlichen Universität Kyoto.
Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)*

(Eingegangen am 16. Februar 1943)

Obwohl die ereptische Peptonspaltung durch Gewebeenzyme bei alkalischer Reaktion schon von früher her gut bekannt ist, bleibt noch viel zu studieren übrig, bis die Proteolyse dieser Substanz bei saurer Reaktion erkannt ist.

In einer früheren Arbeit haben bereits Waldschmidt-Leitz und Mitarbeiter (1930) kurz über die Peptonspaltung durch Gewebeenzyme bei saurer Reaktion berichtet.

Nach Freudenberg's Arbeit (1940) kommt auch in Magensaft die Kathepsinwirkung vor, für die nur genuine Eiweisskörper als hydrolysierbares Kathepsin-Substrat in Betracht kamen, nicht aber Witte-Pepton.

In den vorangegangenen Abhandlungen haben Utzino und Verf. (1941 und 1943) die katheptische Spaltung der Peptonkörper von verschiedener Herkunft bei $\text{pH } 5$ durch Leber-, Niere- und Milzenzym des Schweins als sicher bestätigt.

In hiesigem Institut hat auch Hirooka (1942) die Spaltung der Peptonkörper, die er aus verschiedenen Eiweisskörpern nach maximaler Einwirkung des Hundemagensaftes oder der Magenmucosa-Mazeration bereitet hatte, durch ereptasefreie Katheptase der Schweineleber festgestellt. Darauf hin hat Verf. sich hier weiter mit diesem Problem beschäftigt, um noch Genaueres zur Kenntnis der katheptischen Peptonspaltung beizutragen. Zuerst

kommen die vergleichenden Beobachtungen mit der Gewebeereptase und die Unterscheidung zwischen den beiden Peptolysensystemen zur Beobachtung.

In der sauren Seite der Peptondigestion durch die Lebermazeration konstatierte man eine deutliche Aciditätszunahme, die durch Cysteinzusatz stark gefördert werden konnte, durch Schwefelwasserstoff aber schwach oder fast nicht im Digestat mit Gelatopepton (Chen et al., 1940), das nach wiederholter Einwirkung der Magenmucosa-Mazeration hergestellt und auch schon in der vorangegangenen Arbeit gebraucht wurde (Tabelle I u. II). Bei der alkalischen Reaktion wurde eine verstärkende Wirkung des zugesetzten Cysteins kaum beobachtet.

Um diese Cysteinaktivierung der Peptonhydrolyse bei saurer Reaktion noch in kleineren Molekülteilen des Peptons festzustellen, liess man das Witte-Pepton gegen destilliertes Wasser dialysieren und beobachtete das Verhalten der getrennten Fraktionen gegenüber dieser Enzymwirkung unter Cysteinzusatz. Das Dialysat des Witte-Peptons zeigte ebenso wie die dialysierte Peptonlösung eine deutliche Spaltung bei saurer und alkalischer Reaktion (Tabelle III).

Die Hydrolyse wurde bei saurer Reaktion von pH 5–6 durch Cysteinzusatz deutlich aktiviert.

Hierauf hat man weiter die Säureinaktivierung der Peptonhydrolysierenden Enzyme der Schweineleber untersucht. Die Ergebnisse erwiesen, dass schon nach einer Salzsäurewirkung von pH 4 und bei 37°C (40 Min.) auf die Lebermazeration, die eine breite Aktivität von Peptonspaltung zeigte, die Peptonhydrolyse bei pH 7,5 fast vollständig aufgehoben wird, während dieselbe bei pH 5 noch deutlich erhalten bleibt (Tabelle IV). Die Säurewirkung bei pH 4,5 war nicht sehr auffallend, da sie nach einer längeren Aufbewahrung bei pH 4,5 (z. B. 48 Stunden lang) die beiden Enzymwirkungen schädigte.

Auf Grund dieser Ergebnisse konnte man hier auch sicher die Trennung der katheptischen Peptonspaltung von der ereptischen Peptonspaltung ausführen, indem man die Lebermazeration mit Wasser oder Glycerin bei pH 4 und 37°C 60 Min. lang stehen liess

(Tabelle V). Die gleichen Resultate hat man auch bei den Versuchen mit Nieren- und Milzmazeration erzielt (Tabelle V), wie man schon die Kathepsinwirkung (katheptische Proteinase im engeren Sinne) getrennt hat.

Im Gegenteil zu der Säureinaktivierung ging die katheptische Peptonspaltung nach der Aufbewahrung bei alkalischer Reaktion (z. B. bei pH 8 und 37°C 48 Std. oder besser bei pH 9,5 und 37°C 1–2 Std. lang) verloren, wie bereits bei der Besprechung der Kathepsininaktivierung erwähnt wurde (Tabelle VI). Die Gewebeereptase zeigte also starken Widerstand gegenüber der Alkaliwirkung bei 37°C .

Hier hat man wiederum die Cysteinaktivierbarkeit der katheptischen Peptonspaltung bestätigt, die durch das Säure-Verfahren von der Ereptase getrennt wurde. Die Aktivierung trat am stärksten bei pH 4–5 auf und diejenige der Gelatopepton-Spaltung steht niedrig, wie das bei der nicht getrennten Peptonasewirkung der Fall war (Tabelle VII).

Was die optimale Reaktion dieser ereptasefreien katheptischen Peptonspaltung der Leber, Niere oder Milz des Schweines anbelangt, liegt sie bei pH 4–5, und das einzelne Organ zeigt eine Verschiebung der Reaktion in diesem Optimalbereich, wie z. B. bei pH 5 für die Leber und bei pH 4–4,4 für die Milz (Tabelle VIII).

Auf Grund dieser Beobachtungen kommt nun die Spaltung des Proteins, des Peptons und des Benzoyldiglycins als Katheptase-Substrat in Frage.

Über die Unterscheidung zwischen diesen Enzymwirkungen möchte Verf. in der folgenden Abhandlung sprechen. Hier kam zuerst die Verteilung oder die Löslichkeit dieser Katheptasewirkungen, die sich als ereptasefrei erwies, in Betracht. Wie die Ergebnisse zeigen, trat die katheptische Gelatinespaltung, unabhängig von der abgetrennten Flüssigkeit oder von der Bodensatzsuspension, erst nach der Cysteinaktivierung ein und der Hydrolysegrad liess sich bei den beiden Enzymfraktionen nicht unterscheiden (Tabelle IX). Die Bodensatzsuspension entfaltete schon eine starke Aktivität der Peptonasewirkung, die durch Cysteinzusatz stark aktiviert wurde, während die getrennte Flüssigkeit erst nach der

Cysteinaktivierung wirksam wurde. Der Spaltungsgrad durch die Bodensatzsuspension steht ausserdem viel höher als der durch die getrennte Flüssigkeit.

Hier sei auch hervorgehoben, dass Benzoyldiglycin nur durch die Bodensatzsuspension angegriffen wurde.

Diese Beobachtungen scheinen die Nicht-Einheitlichkeit dieser Katheptasewirkungen anzudeuten. Zuletzt kommt das Spaltungsvermögen der ereptasefreien Katheptase auf Witte-Pepton in Frage. Das Witte-Pepton wurde der Digestion mit der ereptasefreien Katheptase der Schweineleber so oft unterzogen, bis die Aciditätszunahme nicht mehr nachweisbar war. Dies Digestat, welches durch die Katheptase nicht mehr angegriffen, aber durch Hundedarmsaft hydrolysiert werden konnte, zeigte noch nach der Salzsäurehydrolyse eine deutliche Zunahme des Aminostickstoffs (Tabelle X).

Auf Grund dieser Ergebnisse kann man wohl unter dem Katheptase-Digestat des Peptons eine noch hydrolysierbare Abbaustufe annehmen, die der weiteren Katheptase-Wirkung widersteht, aber durch die Erepsinwirkung des Hundedarmsaftes angegriffen wird.

Über diese Abbauprodukte des Proteins durch die Katheptasewirkung möchte Verf. demnächst an anderer Stelle berichten.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. In der vorliegenden Arbeit hat man weiter die Peptonspaltung durch die Gewebeenzyme studiert. In einem breiten Bereich von saurer und alkalischer Reaktion wurden die Peptonkörper deutlich durch die Gewebemazerationen angegriffen und der Cystein- oder H_2S -Zusatz wirkte verstärkend auf ihre Spaltung nur bei saurer Reaktion von pH 5–6, nicht aber bei alkalischer.

Bei den Versuchen mit dem Pepton-Dialysat, welches vielleicht der niedrigeren Abbaustufe des Witte-Peptons entsprechen muss, wurden auch die gleichen Resultate der Hydrolyse und der Cysteinaktivierung bei pH 5–6 erhalten.

2. Durch das Säure-Verfahren bei pH 4 (37°C 40 Min.) wurde die Peptonhydrolyse bei pH 7.5 vermisst, sie trat aber dagegen

bei P_H 5 auf, während die ereptische Peptonspaltung bei P_H 7,5 nach der Alkali-Behandlung bei P_H 8,5 ($37^\circ C$ 1–2 Std.) erhalten blieb, indem die katheptische bei P_H 5 verloren ging. Diese ereptisch inaktive katheptische Peptonspaltung trat am günstigsten bei P_H 4–5 auf und wurde auch durch Cystein aktiviert.

3. Das Witte-Pepton-Digestat, das der wiederholten Einwirkung der ereptasefreien Leber-Katheptase unterzogen worden war und sich nicht mehr spaltbar durch dasselbe Enzym erwies, wurde weiter durch den Hundedarmsaft angegriffen und zeigte noch eine Aminostickstoff-Zunahme nach der Salzsäurehydrolyse.

Dem Unterrichtsministerium sei an dieser Stelle bestens gedankt für die Gewährung einer Unterstützung zur Anregung wissenschaftlicher Forschung. Prof. Dr. S. Utzino.

LITERATUR.

- Chen, T., Hirooka, T. u. Kawaharada, M. (1940): Dieses Journ., **31**, 335.
Freudenberg, E. (1940): Enzymologia, **8**, 385.
Hirooka, T. (1942): Tohoku Journ. exp. Med., **42**, 287.
Sakai, T. (1943): Diese Journ., **36**, 383.
Utzino, S. u. Sakai, T. (1941): ibidem, **33**, 457.
Waldschmidt-Leitz, E., Schöffner, A., Bek, J. J. u. Blum, E. (1930): Zeits. f. physiol. Chem., **188**, 17.

Experimenteller Teil.

TABELLE I.

Einfluss des Cystein- oder H₂S-Zusatzes auf die Pepton-Witte-Spaltung bei verschiedenen PH-Werten durch die Lebermazeration des Schweines.

2 cem Lebermazeration, die aus 1 Teil Leberbrei und 3 Volumteilen Glycerin-Wasser bestand, liess man mit 2 cem 0,05 Mol-Cysteinlösung bei PH 6 und 37°C 30 Min. lang stehen und verglich ihre Aktivität mit derjenigen der Kontrolle, die nur mit der Mazeration ohne Cystein unter Wasserzusatz aufbewahrt wurde. Zur Prüfung liess man durch 2 cem Mazeration 30 Min. lang Schwefelwasserstoff durchströmen.

Versuchsansatz: 5 cem 8%ige Peptonlösung + 2 cem Lebermazeration mit 2 cem Cysteinlösung oder 2 cem Wasser zur Kontrolle + 11 cem Phosphatpuffer + Toluol; bei 37°C digeriert. Zur Kontrolle wurde Enzym-Puffer ohne Pepton unter den gleichen Verhältnissen wie in den Hauptversuchen digeriert.

Aciditätszunahme in 4 cem Digestat (cem 0,1 n-NaOH)									
Std. PH	24	72	120	24	72	120	24	72	120
	Ohne Cystein (a)			Mit Cystein (b)			Aktivierung (b-a)		
4	0,35	0,35	0,35	0,64	1,19	1,32	0,29	0,84	0,97
5	0,75	0,72	0,82	1,1	1,57	1,97	0,35	0,85	1,15
6	1,34	1,51	1,86	1,5	2,1	2,35	0,16	0,59	0,49
7	1,38	1,73	2,2	1,4	2,08	2,33	0,02	0,35	0,11
7,5	1,38	1,73	2,0	1,3	1,83	2,2	-0,08	0,1	0,2
8	1,3	1,62	1,9	1,27	1,68	2,08	-0,03	0,06	0,18
Std. PH	24	72	120	24	72	120	24	72	120
	Ohne H ₂ S (a)			Mit H ₂ S (b)			Aktivierung (b-a)		
4	0,4	0,33	0,41	0,7	0,67	0,64	0,3	0,34	0,23
5	0,72	0,7	0,93	0,9	1,07	1,3	0,18	0,37	0,37
6	1,42	1,63	1,82	0,88	1,35	1,5	-0,54	-0,25	-0,32
7	1,52	1,77	1,89	1,17	1,45	1,7	-0,35	-0,32	-0,19
7,5	1,45	1,65	1,8	1,25	1,55	1,72	-0,2	-0,1	-0,08
8	1,34	1,66	1,8	1,12	1,44	1,62	-0,22	-0,22	-0,18

Die Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat wurde nach Sörensen bestimmt und die Differenzwerte sind in Tabellen angegeben, nachdem die Kontrollwerte von den Hauptversuchswerten abgezogen sind.

TABELLE II.

Einfluss des Cystein- oder H₂S-Zusatzes auf die Gelatopepton-Spaltung durch die Lebermazeration des Schweines.

Hier kam Gelatopepton zur Verwendung, das aus Gelatine-Digestat nach wiederholter Einwirkung von Hundemagensaft mit Aceton ausgefällt und getrocknet wurde (Chen et al., 1940).

Die Versuchsbedingungen ebenso wie in Tabelle I.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)									
Std.	24	72	120	24	72	120	24	72	120
PH	Ohne Cystein (a)			Mit Cystein (b)			Aktivierung (b-a)		
4	0,31	0,38	0,42	0,7	0,9	1,15	0,39	0,52	0,73
5	0,35	0,65	0,73	0,65	1,37	1,68	0,3	0,72	0,95
6	0,5	0,64	0,88	0,93	1,83	2,01	0,43	1,19	1,13
7	0,52	0,67	0,89	0,65	1,1	1,15	0,13	0,44	0,26
7,5	0,5	0,53	0,8	0,55	0,7	0,89	0,05	0,17	0,09
8	0,33	0,55	0,67	0,35	0,84	0,7	0,02	-0,07	0,03
	Ohne H ₂ S (a)			Mit H ₂ S (b)			Aktivierung (b-a)		
4	0,25	0,4	0,4	0,4	0,5	0,50	0,15	0,1	0,1
5	0,23	0,71	0,66	0,4	0,75	0,75	0,17	0,04	0,09
6	0,38	0,71	0,7	0,29	0,57	0,72	-0,09	-0,13	0,02
7	0,45	0,8	0,78	0,3	0,5	0,6	-0,15	-0,3	-0,18
7,5	0,42	0,72	0,67	0,33	0,48	0,58	-0,09	-0,24	-0,09
8	0,32	0,55	0,6	0,26	0,43	0,43	-0,04	-0,12	-0,17

TABELLE III.

Spaltung des dialysierten Witte-Peptons und seines Dialysats durch die Lebermazeration unter Cysteinzusatz.

Die Pepton-Witte-Lösung (20% 50 ccm) liess man unter Toluol in einem Kollodiumsäckchen gegen 300 ccm destilliertes Wasser

während 12 Stunden dialysieren.

Nach einer Woche verdampfte man das gesamte Dialysat (ca. 4 Liter) bei 40°C mittels Föns, bis die Gesamtmenge ungefähr 50 ccm betrug.

Versuchsansatz: 2 ccm dialysierte Mutterlösung oder verdampftes Dialysat + 2 ccm Lebermazeration mit 2 ccm 0,05 Mol-Cysteinlösung oder 2 ccm Wasser ohne Cystein + 14 ccm Phosphatpuffer + Toluol. Die Lebermazeration und ihre Aktivierung ebenso wie in Tabelle I. Die korrigierten Werte der Aciditätszunahme in den Hauptversuchen in der Tabelle angegeben.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)							
Std. Aktivierung Substrate P_H		24	72	24	72	24	72
		Ohne Cystein (a)		Mit Cystein (b)		(b-a)	
Dialysiertes Pepton	4	0,24	0,27	0,56	0,8	0,32	0,53
	5	0,55	0,9	0,95	1,43	0,4	0,53
	6	1,38	1,83	1,61	2,06	0,23	0,23
	7	1,53	1,88	1,5	1,95	-0,03	0,07
	8	1,3	1,52	1,36	1,56	0,06	0,04
Pepton-Dialysat (eingeeengt)	4	0,04	0,1	0,24	0,53	0,2	0,43
	5	0,38	0,5	0,61	1,14	0,23	0,64
	6	0,74	1,16	1,18	1,63	0,44	0,47
	7	1,17	1,77	1,32	1,95	0,15	0,18
	8	1,08	1,56	1,13	1,57	0,05	0,01

TABELLE IV.

*Säureinaktivierung der ereptischen und katheptischen
Peptonase der Schweineleber bei 37°C.*

50 ccm Lebermazeration, die aus 1 Teil Leberbrei und 2 Volum-Teilen Wasser bereitet wurde, liess man nach Einstellen bei P_H 4 und 4,5 mit 3%iger HCl-Lösung bei 37°C im Brutschrank stehen. Nach einer gewissen Zeitfrist pipettierte man die Mazeration ab, die dann in den Versuchen geprüft wurde. Die enzymologische Wirkung der behandelten Lebermazeration wurde bei P_H 5 und

7,5 geprüft.

Versuchsansatz: 5 ccm 8% Peptonlösung + 2 ccm Lebermazeration + 13 ccm Puffer + Toluol.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 <i>n</i> -NaOH)					
Behandlungs- dauer	Digestions-PH u. Zeit (Std.)	PH 5,0		PH 7,5	
		24	72	24	72
Inaktivierung bei PH 4	30 Min.	0,67	0,80	0,25	0,48
	40 "	0,45	0,60	0,02	0,03
	1 Std.	0,37	0,51	0	0,03
	1,5 "	0,37	0,4	-0,02	-0,02
	2 "	0,37	0,4	-0,02	-0,04
	24 "	0,22	0,23	0	0,01
	48 "	0	0,02	0,02	0,01
Inaktivierung bei PH 4,5	1 Std.	0,8	1,2	1,15	1,17
	1,5 "	0,8	1,23	0,43	0,85
	2 "	0,87	1,28	0,45	0,93
	12 "	0,58	1,0	0,42	0,64
	24 "	0,33	0,4	0,42	0,62
	48 "	0,16	0,15	-0,02	-0,02
Kontrolle ohne Behandlung		1,14	1,43	1,48	2,63

TABELLE V.

Trennung der Katheptase-Wirkung der Schweineorgane von der ereptischen Peptonase durch die Säure-Inaktivierung.

Hier kamen Wasser- oder Glycerin-Mazerationen aus Leber, Niere oder Milz des Schweines in Betracht, indem 1 Teil Gewebefrei mit 3 Volumteilen Mazervationsflüssigkeit gut zerrieben und koliert wurde. Die Säureinaktivierung erfolgte durch die Aufbewahrung der Mazeration bei PH 4 (HCl-Zusatz) und 37°C und einer Zeitdauer von 60 Min.

Versuchsansatz: 5 ccm 8% ige Substratlösung + 2 ccm Mazeration + 13 ccm Puffer + Toluol.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm, 0,1 n-NaOH)									
Organe	Substrate	Zeit(Std.) PH	Glycerin-Mazeration			Wasser-Mazeration			
			24	72	120	24	72	120	
Leber-mazeration	Pepton (Witte)	4	0,26	0,26	0,3	0,16	0,25	0,27	
		5	0,35	0,35	0,4	0,25	0,32	0,35	
		6	0,17	0,23	0,23	0,05	0,16	0,12	
		7	0,06	0,14	0,17	0,07	0,07	0,07	
		7,5	0,02	0,02	0,05	0,05	0,02	0	
		8,2	0,02	0,04	0,07	0,04	0,03	0	
	Casein (Hammarsten)	5	0,25	0,58	0,58	0,29	0,36	0,36	
	Nieren-mazeration	Pepton (Witte)	4	0,3	0,4	0,43	0,3	0,35	0,37
			5	0,26	0,4	0,42	0,26	0,33	0,33
			6	0,03	0	0,17	0,07	0,17	0,07
7			0	-0,04	0,03	0,02	0,04	0	
7,5			0,02	-0,03	0,02	0,01	0	0,03	
8,2			0,03	0,01	0,03	0,02	0	0	
Casein (Hammarsten)		5	0,34	0,52	0,62	0,3	0,4	0,43	
Milz-mazeration		Pepton (Witte)	4	0,36	0,4	0,28			
			4	0,23	0,36	0,4	0,28	0,32	0,38
			5	0,21	0,24	0,28	0,22	0,2	0,28
	6		0,03	0,02	0,06	0,05	0,05	0,03	
	7		0,02	0,04	0,12	-0,04	-0,04	-0,04	
	7,5		0,02	0,02	0,07	-0,02	-0,02	0,03	
	8,2	0,05	0,07	0,1	0,02	0	0,02		
	Casein (Hammarsten)	5	0,29	0,67	0,69	0,27	0,42	0,42	

TABELLE VI.

Alkalinaktivierung der katheptischen Peptonase der Schweineleber bei 37°C.

Die Lebermazeration, die aus 1 Teil Leberbrei und 2 Volum-

teilen Wasser bereitet wurde, bewahrte man nach Einstellen bei PH 8, 8,5, 9,0 oder 9,5 mit 3%iger Natronlauge im Brutschrank (37°C) verschiedene Zeit lang auf. Nach dieser Alkalibehandlung wurde ihre Wirkung bei PH 5 und 7,5 untersucht. Für die Aktivierung der katheptischen Enzyme behandelte man je 2 ccm Lebermazeration mit 2 ccm 0,1 Mol Cysteinlösung bei PH 6 und 37°C während 30 Min..

Versuchsansatz: 5 ccm 8%ige Peptonlösung und 2 ccm Enzym-

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)										
Behandlungs-PH und Zeit			Digestions-PH und Zeit(Std.)		PH 5,0			PH 7,5		
					24	72	120	24	72	120
PH 8	{	30 Min.		0,34	0,61	0,64	0,94	1,16	1,23	
		1 Std.		0,3	0,68	0,68	0,80	1,05	1,09	
		1,5 "		0,19	0,53	0,6	0,83	1,1	1,1	
		2 "		0,2	0,45	0,42	0,75	0,98	1,03	
		48 "		0	0,01	0,03	0,23	0,50	0,53	
PH 8,5	{	30 Min.		0,25	0,47	0,55	0,95	1,08	1,08	
		1 Std.		0,2	0,45	0,5	0,95	1,13	1,1	
		1,5 "		0,2	0,37	0,4	0,75	0,99	0,9	
		2 "		0,1	0,32	0,37	0,78	0,95	0,95	
		48 Std.		—	—	—	—	—	—	
PH 9,0	{	30 Min.		0,11	0,25	0,32	0,9	1,13	1,08	
		1 Std.		0,12	0,22	0,37	0,83	1,03	1,07	
		1,5 "		0,1	0,22	0,32	0,83	1,1	1,03	
		2 "		0,03	0,2	0,31	0,76	1,05	0,97	
		48 "		—	—	—	0,35	0,55	0,57	
PH 9,5	{	30 Min.		0,08	0,07	0,2	0,87	1,02	1,03	
		1 Std.		0,01	0,02	0,13	0,9	1,1	1,05	
		1,5 "		0	0,03	0,17	0,84	1,03	1,1	
		2 "		0,03	0	0,12	0,8	0,97	1,0	
		48 "		—	—	—	0,33	0,55	0,53	
Kontrolle ohne Behandlung				0,48	0,75	0,93	1,17	1,92	1,92	
Ohne Cystein				0,81	1,64	1,84	—	—	—	
Mit Cystein										

oder 4 ccm Enzym-Cystein-Lösung mit Puffer auf 20 ccm gebracht und digeriert bei PH 5 und 7,5.

TABELLE VII.

Cystein-Aktivierung der ereptasefreien katheptischen Peptonase der Schweineleber.

Die in der vorigen Tabelle angegebene Glycerin-Lebermazeration kam zur Anwendung, die durch die Säureinaktivierung von der Ereptase befreit wurde. Zur Aktivierung wurden 2 ccm Lebermazeration mit 2 ccm 0,1 Mol Cysteinlösung bei PH 6 und 37°C 30 Min. lang stehen gelassen.

Versuchsansatz: 5 ccm 8%ige Peptonlösung + 2 ccm Mazeration mit 2 ccm Cysteinlösung oder 2 ccm Wasser ohne Cystein + 11 ccm Puffer + Toluol.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 <i>n</i> -NaOH)										
		a) Ohne Cystein			b) Mit Cystein			Aktivierung (b-a)		
P _H	Zeit (Std.)	24	72	120	24	72	120	24	72	120
Pepton- Witte	4	0,13	0,18	0,15	0,27	0,42	0,65	0,14	0,24	0,50
	5	0,25	0,28	0,30	0,4	0,57	0,72	0,15	0,29	0,42
	6	0,05	0,05	0,03	0,19	0,27	0,35	0,14	0,2	0,32
	7	0,03	0,03	0	0	0,01	0,03	-0,03	-0,02	0,03
	7,5	0	-0,02	-0,01	-0,03	0	0,03	-0,03	0,02	0,04
	8	0,02	0,03	0,05	0	0	0,01	-0,02	-0,03	-0,04
Gelato- pepton (nach Chen)	4	0,03	0,05	—	0,18	0,33	—	0,15	0,28	—
	5	0,09	0,27	—	0,21	0,42	—	0,12	0,15	—
	6	0,1	0,1	—	0,1	0,29	—	0	0,19	—
	7	-0,02	0,05	—	-0,07	0,04	—	-0,05	-0,01	—
	7,5	0,03	0,03	—	0,05	0,03	—	0,02	0	—
	8	0,03	0,08	—	0,05	0,03	—	0,02	-0,05	—

TABELLE VIII.
Optimal-Reaktion der Peptonspaltung durch das ereptasefreie Enzym der Schweineorgane.

Die Organmazeration (1:3), die zum Zweck der Inaktivierung der ereptischen Peptonase bei Lösung einwirken.

Versuchsansatz: 5 cem 8%ige Pepton-Witte-Lösung + 2 cem Organmazeration + 13 cem Phosphatpuffer + Toluol.

Organe	Digestions-PH Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 4 cem Digestat (cem 0,1 n-NaOH)										
		3,0	3,6	4,0	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	5,4	5,6
Leber	5	0	0,15	0,22	0,22	0,22	0,24	0,25	0,36	0,23	0,25	0,13
	24	0,01	0,35	0,49	0,5	0,48	0,5	0,6	0,64	0,5	0,45	0,28
	72	0,07	0,42	0,72	0,73	0,9	0,92	0,88	0,9	0,77	0,54	0,35
Milz	5	0,04	0,25	0,28	0,27	0,24	0,2	0,25	0,25	0,26	0,25	0,18
	24	0,03	0,45	0,68	0,61	0,6	0,55	0,5	0,55	0,48	0,5	0,36
	72	0,02	0,62	0,85	0,75	0,77	0,76	0,7	0,75	0,65	0,52	0,4
Niere	5	0,01	0,11	0,40	0,38	0,38	0,32	0,27	0,27	0,28	0,25	0,21
	24	0,01	0,37	0,77	0,78	0,84	0,77	0,77	0,75	0,73	0,53	0,36
	72	0,02	0,45	0,88	1,05	0,99	0,94	1,02	0,9	0,93	0,63	0,53

TABELLE IX.

Verteilung der aktiven und inaktiven aktivierbaren Katheptase.

Die Leberpulver, die durch Säureinaktivierung von Ereptase befreit und nach der Aceton-Äther-Methode getrocknet wurden, suspendierte man in 10 Volumteilen Wasser unter guter Zerreibung und zentrifugierte sie ab.

Der abgeschleuderte Bodensatz, der wieder in der originalen Volummenge Wasser suspendiert wurde, und die abgetrennte Flüssigkeit kamen in Betracht.

Versuchsansatz: 5 ccm 8% Substrat- oder 0,2 Mol Benzoyldiglycinlösung + 2 ccm Enzymlösung oder Suspension mit 2 ccm 0,1 Mol Cysteinlösung oder Wasser ohne Cystein + Toluol.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat bei P _H 4,5 (ccm 0,1 <i>n</i> -NaOH)												
Sub- strate	Bodensatzsuspension						Abgetrennte Flüssigkeit					
	Ohne Cystein			Mit Cystein			Ohne Cystein			Mit Cystein		
	24	72	120	24	72	120	24	72	120	24	72	120
Gelatine (Merck)	0,01	0	0,02	0,25	0,48	0,56	0	-0,1	0,03	0,2	0,43	0,67
Pepton K B	0,33	0,58	0,77	0,79	1,05	1,25	0,05	0,08	0,13	0,35	0,63	0,88
Benzoyldi- glycin	0,08	0,12	0,25	—	—	—	0	0,02	0,05	—	—	—

TABELLE X.

Maximale Spaltung des Witte-Peptons durch die ereptasefreie Leberkatheptase des Schweines.

20 ccm 10%ige Pepton-Witte-Lösung wurden mit 10 ccm 10%iger Katheptasesuspension, die mit den durch das Säure-Verfahren von der Ereptase befreiten Leberpulvern bereitet und dann mit 10 ccm 0,1 Mol Cysteinlösung bei P_H 6 und 37°C 30 Min. lang behandelt wurde, mit 80 ccm Puffer unter Toluol bei P_H 4,5 und 37°C digeriert.

Nach jeder wöchentlichen Digestion fügte man wieder je 10 ccm

Enzymsuspension der Digestionslösung hinzu. Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne Pepton.

Aciditätszunahme in 4 ccm Peptondigestat bei PH 4,5 (ccm 0,1 n-NaOH)				
Versuche \ Zeit	Sofort	3 Tage	5 Tage	7 Tage
Hauptversuch	3,9	5,1	5,25	5,35
Kontrolle	3,07	3,15	3,15	3,17
Zunahme		1,12	1,27	1,35
2ter Zusatz				
Hauptversuch	5,4	5,93	5,99	5,99
Kontrolle	3,4	3,5	3,55	3,55
Zunahme		0,43	0,44	0,44
3ter Zusatz				
Hauptversuch	6,05	6,25	6,3	6,3
Kontrolle	3,83	3,95	4,0	4,03
Zunahme		0,08	0,08	0,05

Salzsäure-Hydrolyse: Nach der dritten Digestion wurde das Peptondigestat abfiltriert und 20 ccm Filtrat mit 10 ccm 38%iger Salzsäure am Rückfluss 8 Stunden lang gekocht. Vor und nach der Hydrolyse wurde der Aminostickstoff in 2 ccm einer aufs 10fache verdünnten Lösung nach van Slyke bestimmt. Die Resultate sind in der Tabelle angegeben.

NH ₂ -N in 2 ccm (mg) vor und nach der Hydrolyse des Peptondigestats			
	Peptondigestat	Hydrolysat	Zunahme in 2 ccm Hydrolysat
a) Hauptversuch	0,2227	0,3544	
b) Kontrolle	0,1485	0,1832	
a-b	0,0742	0,1712	0,0970

Darmsaft-Hydrolyse: 20 ccm Filtrat des Peptondigestats wurden nach Umpufferung bei PH 7,5 mit 2 ccm frischem Darmsaft (aus Hundedarmfistel) unter Toluol digeriert. Andererseits liess

man auch 20 ccm Filtrat unter weiterem Zusatz von 2 ccm Katheptasesuspension (0,2 g ereptasefreie Leberpulver in 2 ccm Wasser), die mit 2 ccm 0,1 Mol Cysteinlösung aktiviert wurde, der Digestion unter Toluol bei P_H 4,5 unterwerfen. Kontrolle mit Enzympuffer ohne Filtrat. Zur Versicherung der Katheptaseaktivität diene auch ein Ansatz mit Witte-Pepton.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 <i>n</i> -NaOH)							
Enzyme	Substrate	Ohne Cystein			Mit Cystein		
		Zeit (Std.)					
		24	72	120	24	72	120
Darmsaft (P_H 7,5)	Peptondigestat	0,63	0,75	0,73	—	—	—
Ereptasefreie Katheptase (P_H 4,5)	"	—	—	—	-0,07	0,03	0,09
"	Witte-Pepton	0,2	0,35	0,45	0,67	1,24	1,37

ÜBER DIE GEWEBEPROTEOLYSE.

IV. Mitteilung: Unterscheidung der katheptischen Peptonasewirkung von der Proteinasewirkung.

VON

TOORU SAKAI.

*(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Fakultät der
Kaiserlichen Tohoku-Universität (Sendai) und aus dem Utzino-
Laboratorium des Instituts für Chemische Forschung
an der Kaiserlichen Universität Kyoto.
Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)*

(Eingegangen am 16. Februar 1943)

In den vorangegangenen Abhandlungen haben Utzino (1941) und Verf. (1943) schon darauf aufmerksam gemacht, dass man die Proteinase-, Peptonase- und Aeyldipeptidasewirkung in der Hauptsache in der ereptasefreien Katheptasefraktion der Schweineleber erkannt hat und nun taucht eine neue Frage auf, ob man unter diesen Enzymwirkungen noch weitere Unterscheidungen machen kann. Die vorige Beobachtung (Sakai, 1943), dass der Wasserextrakt jener Fällung der ereptasefreien Katheptasefraktion eine stärkere Aktivität der Peptonspaltung als die der Gelatinespaltung entfalten konnte, deutet schon die Verschiedenheit der Enzymeigenschaften an.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten der Katheptasefraktion gegenüber den Inaktivierungsprozeduren untersucht, um die partielle Ausschaltung der einen oder anderen Wirkung zu erzielen. Bevor Verf. auf das Studium der Inaktivierung eingeht, möchte er erst über die Aktivitätsveränderung bei der Aufbewahrung im Eisschrank sprechen. Bei einer kurzfristigen Aufbewahrung im Eisschrank scheint die Peptonasewirkung etwas mehr als die Kathepsinwirkung beeinträchtigt zu werden (Tabelle I-a).

Unter den geprüften Säuren scheint Essigsäure etwas schädigend auf die Katheptasewirkung einzuwirken (Tabelle I-b).

Zu präparativem Zweck hat man hier die Aktivität der verschiedenen Niederschläge geprüft. Die Acetonfällung aus der Gesamtmazeration erwies sich als etwas stärker aktiv als der unlösliche Bodensatz in der zentrifugierten Mazeration; diese Tatsache mag für das, wenn auch geringe, Vorhandensein einer Lyoform neben dem Desmoform sprechen (Tabelle II). Aus der abzentrifugierten oberen Lösung konnte man nur eine minderwertig aktive Fällung mit Aceton erzielen.

Hier sei nun hervorgehoben, dass der Alkaliwirkung z. B. bei P_H 7,7 und $37^\circ C$ gegenüber die Peptonaseaktivität widerstand, während die Gelatinehydrolyse schon nach 30 Minuten Alkaliwirkung vermisst wurde (Tabelle III).

Im gleichen Sinne wirkte die Säure-Behandlung vernichtend auf das Gelatine-Enzym ein. Die Aciditätszunahme wurde in Gelatine-Digestat mit der bei P_H 3,5 und $37^\circ C$ 30 Min. lang behandelten Enzymlösung nicht mehr beobachtet, obwohl dieselbe Enzymfraktion noch deutlich das Witte-Pepton anzugreifen imstande war (Tabelle IV).

Der Hitzebehandlung gegenüber verhält sich die Peptonase auch widerstandsfähiger als das Kathepsin. Die Proteinaseaktivität ging schon nach dem Erhitzen bei $70^\circ C$ 30 Min. verloren, während die Peptonasewirkung noch deutlich auftrat (Tabelle V). Auf Grund dieser Ergebnisse kann man wohl auf die stärkere Resistenz der katheptischen Peptonase gegenüber dem inaktivierenden Eingriff schliessen.

Nun kommt das Adsorptionsverfahren mit einigen Adsorbentien in Betracht. Durch die Adsorbentien schienen die katheptischen Enzyme fast gleichmässig adsorbiert zu werden. Im Eluat mit dem alkalischen Phosphatpuffer von P_H 7,2 besonders aus dem Ferrihydroxydadsorbat oder Tierkohleadsorbat wurde nur die Peptonasewirkung wiedergefunden, während die katheptische Proteinase darin vermisst wurde (Tabelle VI).

Auf Grund dieser Beobachtungen führte man hier ein Beispiel der Trennung der katheptischen Peptonase von der katheptischen Proteinase entweder durch das Alkali-Verfahren bei P_H 7,7 ($37^\circ C$ 30 Min.) oder durch das Säure-Verfahren bei P_H 3,5 ($37^\circ C$ 30

Min.) aus. Um die Inaktivität der katheptischen Proteinase-wirkung mit Sicherheit zu bestätigen, kamen neben Casein auch Fibrin, Albumine und Gelatine zur Verwendung. Diese Eiweisskörper zeigten keine Aciditätszunahme im Digestat bei pH 4,5, das im Gelatine-Versuche mit der doppelten Menge Enzym unter der Mitwirkung des Cysteins ausgeführt wurde (Tabelle VII-a). Diese ereptase- und kathepsinfreie Enzymfraktion vermag noch Peptone von verschiedener Herkunft anzugreifen, obwohl der Hydrolysen-grad einerseits von den Peptonarten und andererseits von den Enzymarten A und B abhängig zu sein scheint (Tabelle VII-b).

Merkwürdigerweise trat die Spaltung des Witte-Peptons sehr auffallend, besonders nach der Cysteinaktivierung auf, während die anderen nur eine schwache Aciditätszunahme zeigten. Diese Peptonkörper mögen vielleicht aus einer niedrigeren Abbaustufe entstehen.

Zuletzt sei hier noch hervorgehoben, dass das Präparat trotz der Cysteinaktivierung nicht mehr Benzoyldiglycin angreifen konnte. Auf Grund dieser Beobachtungen konnte man nun mit Erfolg den Unterschied zwischen der katheptischen Proteinase (Kathepsin im engeren Sinne) und der katheptischen Peptonase in der Gewebekatheptase (Kathepsin im weiteren Sinne), unter der man das saure Proteasensystem der Gewebe verstehen sollte, feststellen. Für die erstere möchte man wohl das Wort „Kathoproteinase“ (Kathepsin im engeren Sinne) und für die letztere das Wort „Kathopeptonase“ benutzen, um eine Verwechslung zu vermeiden.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Hier wird über die Trennung der katheptischen Peptonase von der katheptischen Proteinase der ereptasefreien Katheptase der Schweineleber berichtet. Durch die Aufbewahrung des ereptase-freien Leberenzym bei pH 7,7 (37°C 30 Min.) oder bei pH 3,5 (37°C 30 Min.) wurde die katheptische Proteinase vernichtet, während die katheptische Peptonase noch erhalten blieb. In diesem Enzympräparat wurde auch die Aeyldipeptidase für Benzoyldiglycin vermisst.

2. Der Hitzewirkung bei 70°C (30 Min.) widersteht die Peptonase, nicht aber die Proteinase. Das alkalische Eluat, welches aus dem Ferrihydroxyd- oder Tierkohleadsorbat der ereptasefreien sauren Leberkatheptaselösung gewonnen wurde, erwies sich nur auf Witte-Pepton noch aktiv, nicht aber auf Gelatine. Hierauf schlug Verf. schlechtweg die Kathopeptonase für die katheptische Peptonase und die Kathoproteinase (Kathepsin im engeren Sinne) für die katheptische Proteinase der Gewebekatheptase (Kathepsin im weiteren Sinne) vor.

Dem Unterrichtsministerium sei an dieser Stelle bestens gedankt für die Gewährung einer Unterstützung zur Anregung wissenschaftlicher Forschung. Prof. Dr. S. Utzino.

LITERATUR.

Sakai, T. (1943): Dieses Journ., **36**, 383.

Sakai, T. (1943): ibidem, **36**, 427.

Utzino, S. u. Sakai, T. (1941): ibidem, **33**, 457.

Experimenteller Teil.

TABELLE I-a.

*Einfluss der Aufbewahrung auf die Leberkatheptase
des Schweines.*

Um die Resistenzfrage der katheptischen Wirkungen der Schweineleber zu klären, wurde hier eine Lebermazeration, die aus 1 Teil Leberbrei und 2 Volumteilen Wasser bestand und koliert wurde, dem Säure-Verfahren bei P_H 4 und $37^\circ C$ (40 Min.) unterworfen, nachdem die Mazeration unter Toluol im Eisschrank 4 oder 7 Tage lang aufbewahrt worden war und dann nach der Aceton-Äther-Methode getrocknet. Eine 10%ige Suspension dieses Präparats wurde bei den Versuchen gebraucht.

Versuchsansatz: 5 ccm 8%ige Gelatine- oder 16%ige Peptonlösung + 2 ccm Enzymlösung (0,2 g) + 13 ccm Phosphatpuffer + Toluol; digeriert bei P_H 4,5 und 7,2 und bei $37^\circ C$. Aciditätsbestimmung nach Sörensen in 4 ccm Digestat. Die korrigierten Werte der Aciditätszunahme nach Abzug der Kontrollwerte in Tabellen angegeben.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 *n*-NaOH)

Substrate	Sofort			Aufbewahrung im Eisschrank			
				4 Tage		7 Tage	
	P_H \ Std.	24	72	24	72	24	72
Gelatine (Merck)	4,5	0,5	1,05	0,4	0,85	0,22	0,6
Pepton K A	4,5	0,62	1,08	0,12	0,4	0,15	0,4
Pepton K A	7,2	-0,05	0	0,03	0,01	0	0,01

TABELLE I-b.

*Verhalten der Leberkatheptase des Schweines aufbewahrt bei
 P_H 4 mit einigen Säuren in Raumtemperatur.*

Die Präparatsuspension, die frei von Ereptase ist, bewahrte man nach Einstellen bei P_H 4 mit 5%iger Essigsäure oder Phos-

phorsäure bei Raumtemperatur 30 Min. lang und prüfte sie auf ihre Aktivität.

Versuchsansatz: 5 ccm 8%ige Gelatine- oder 16%ige Pepton K A-Lösung + 2 ccm Enzymlösung (0,2 g) + 13 ccm Phosphatpuffer + Toluol.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat bei PH 4,5 (ccm 0,1 n-NaOH)							
		Gelatine (Merck)			Pepton K A		
Zeit (Std.)		24	72	120	24	72	120
Säuren							
Essigsäure		0,03	0,36	0,51	0,23	0,25	0,40
Phosphorsäure		0,35	0,67	0,70	0,45	0,38	0,47
Milchsäure		0,38	0,68	0,78	0,44	0,50	0,55

TABELLE II.

Verteilung der ereptasefreien Katheptase in der Lebermazeration des Schweines.

Die Lebermazeration (1 Teil Leberbrei: 1,5 Teile Wasser) liess man zuerst bei P_H 4 und 37°C 40 Min. lang stehen, um die Ereptasewirkung auszuschliessen. Nach Einstellung bei P_H 5 erhielt man einerseits eine Acetonfällung aus der Gesamtmazeration und andererseits zentrifugierte man die Mazeration und trennte den Bodensatz von der oberen Flüssigkeit ab, die dann unter 40°C auf dem Wasserbade mittels Föns stark eingeeengt und mit Aceton versetzt wurde, um auch hier eine Acetonfällung zu gewinnen. Der abgeschleuderte Bodensatz wurde ebenfalls durch Acetonzusatz getrocknet.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat bei P_H 4,5 (ccm 0,1 <i>n</i> -NaOH)							
Substrate	Enzyme	Fällung aus Gesamt-mazeration		Getrockneter Bodensatz		Fällung aus oberer Flüssigkeit	
		Std.					
	P_H	24	72	24	72	24	72
Gelatine	4,5	0,29	0,54	0,1	0,3	0,05	0,12
Pepton K A	4,5	0,35	0,5	0,21	0,33	0,02	0,12
Pepton K A	7,2	0	0	-0,03	0,05	0,05	0,03

Versuchsansatz: Ebenso wie in Tabelle I.

Eine 10%ige Enzym-Suspension kam zur Verwendung.

Die Tabellenangaben korrigiert.

TABELLE III.

Trennung der katheptischen Peptonase von der katheptischen Proteinase (Kathepsin) durch die Alkaliinaktivierung.

Hier wurde das Leberpulverpräparat verwendet, das durch die Säureinaktivierung von der Ereptase befreit war und sich noch katheptisch aktiv erwies. Eine 10%ige Pulversuspension in Wasser stellte man bei PH 7,5, 7,7 und 8,0 mit 3% NaOH ein und bewahrte sie bei 37°C verschiedene Zeit lang auf, um dann ihre Aktivität auf Protein und Pepton zu prüfen.

In den Versuchen geschah die Aktivierung der katheptischen Enzyme durch Aufbewahrung von je 2 ccm Lebersuspension (0,2 g Enzympräparat) mit 2 ccm 0,1 Mol Cystein HCl-Lösung (neutralisiert) bei PH 6 und 37°C während 30 Minuten.

Versuchsansatz: 5 ccm 8%ige Substratlösung + 4 ccm Enzym-Cysteingemisch + 11 ccm Phosphatpuffer; digeriert bei PH 4,5 und 37°C unter Toluol.

Die korrigierten Werte nach Abzug des Kontrollwertes (Enzym-Cystein-Puffer) angegeben.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat bei PH 4,5 (ccm 0,1 n-NaOH)							
Substrate		Pepton (Witte)			Gelatine (Merck)		
Aufbe- wahrungs- PH u. Zeit	Zeit (Std.)	24	72	120	24	72	120
PH 7,5	10 Min.	0,5	0,98	1,18	0,02	0,2	0,37
	20 "	0,45	0,85	1,13	0,08	0,2	0,31
	30 "	0,46	0,86	1,1	0,07	0,25	0,35
PH 7,7	10 Min.	0,43	0,7	0,9	0,06	0,03	0,24
	20 "	0,35	0,75	0,96	0,05	0,08	0,25
	30 "	0,35	0,58	0,87	0	0,03	0,08
PH 8,0	10 Min.	0,2	0,52	0,57	0,03	0,07	0,09

TABELLE IV.

*Trennung der katheptischen Peptonase von der katheptischen
Proteinase (Kathepsin) durch die
Säureinaktivierung.*

In diesen Versuchen behandelte man eine 10%ige Enzym-
suspension des Präparats in der Tabelle III bei PH 3,8, 3,5 und
3,0 (mit 3% HCl) und 37°C verschiedene Zeit lang. Versuchs-
anordnungen und Cysteinaktivierung ebenso wie in der Tabelle III.

Aciditätszunahme in 4 cem Digestat bei PH 4,5 (cem 0,1 n-NaOH)								
Substrate		Pepton (Witte)			Gelatine (Merck)			
Aufbe- wahrungs- PH u. Zeit	Zeit (Std.)	24	72	120	24	72	120	
PH 3,8	10 Min.	0,7	1,42	1,8	0,15	0,5	0,78	
	20 "	0,77	1,4	1,81	0,09	0,47	0,5	
	30 "	0,71	1,28	1,5	0,03	0,3	0,47	
PH 3,5	10 Min.	0,5	1,02	1,4	0,05	0,3	0,5	
	20 "	0,45	1,03	1,32	-0,07	-0,02	0,28	
	30 "	0,36	0,88	1,03	0,02	0,09	0,07	
PH 3,0	10 Min.	0,08	0,24	0,32	0,02	-0,02	-0,08	
	20 "	0,05	0,2	0,25	—	—	—	
	30 "	0	0,12	0,24	—	—	—	
	1 Std.	0	0,08	0,08	—	—	—	

TABELLE V.

*Trennung der katheptischen Peptonase von der katheptischen
Proteinase (Kathepsin) durch Hitzeinaktivierung.*

Eine 10%ige Enzymsuspension in Wasser wurde in einem
Reagenzgläschen bei einer bestimmten Temperatur 15–30 Min. lang
erhitzt und dann zu dem Versuch verwendet. Versuchsanordnun-
gen und Cysteinaktivierung: Ebenso wie in der Tabelle III.

Aciditätszunahme in 4 cem Digestat bei PH 4,5 (cem 0,1 n-NaOH)

Substrate	Zeit (Std.)			24	72	120	24	72	120
	60°C 15 min			60°C 30 min					
Gelatine (Merck)	0,25	0,58	0,83	0,23	0,5	0,75			
Pepton K A	0,37	0,72	0,79	0,39	0,67	0,79			
	65°C 15 min			60°C 30 min					
Gelatine (Merck)	0,26	0,49	0,62	0,08	0,28	0,44			
Pepton K A	0,32	0,77	0,8	0,19	0,45	0,42			
	70°C 15 min			70°C 30 min					
Gelatine (Merck)	0,02	0,22	0,31	0,01	0,06	0,13			
Pepton (Witte)	0,35	0,9	1,25	0,23	0,65	0,98			
Pepton K A	0,02	0,22	0,35	0,05	0,25	0,4			
	75°C 15 min			75°C 30 min					
Gelatine (Merck)	0	0	-0,04	-0,05	-0,03	0,07			
Pepton (Witte)	0,25	0,4	0,47	0	0,17	0,22			
Pepton K A	0,03	0,2	0,23	-0,02	0	-0,07			
	* 75°C 15 min mit Cystein			75°C 30 min mit Cystein					
Gelatine	0	-0,01	-0,01	-0,03	0	0,1			
Pepton (Witte)	0,21	0,45	0,55	0	0,2	0,23			
	** 75°C 15 min mit Cystein								
Gelatine (Merck)	-0,05	0	0,08						
Pepton (Witte)	0,11	0,38	0,53						
	80°C 15 min								
Gelatine (Merck)	0,03	0	0						
Pepton (Witte)	0,03	0,03	0,03						
Pepton K A	0,01	0	0,02						

Bei Erhitzen auf 75°C (15 und 30 Min.) wurde die Enzymsuspension vorher mit der gleichen Volummenge 0,1 Mol Cysteinlösung vermischet, und dann ohne weiteren Cysteinzusatz geprüft.

** Nach der oben erwähnten Erhitzung auf 75°C (15 Min.) mit Cystein liess man 4 ccm dieser Enzym-Cystein-Lösung unter erneutem Zusatz von 4 ccm 0,1 Mol-Cysteinlösung (37°C Zeitdauer 30 Min.) auf 5 ccm 8%ige Substratlösung mit 7 ccm Puffer einwirken.

TABELLE VI.

Verhalten der Katheptasenenzyme der Schweineleber bei dem Adsorptionsverfahren.

Adsorptions- und Elutionsverfahren: 16 ccm Flüssigkeit, die von einer 10%igen Wassersuspension des ereptasefreien Leberpulvers (Tabelle III) in der Zentrifuge abgetrennt wurde, hat man unter Einstellung bei P_H 4 mittels 5%iger Milchsäure mit einer bestimmten Menge Adsorbens (od. Suspension) gut geschüttelt.

Nach 30 Min. Umrühren wurde die Flüssigkeit in der Zentrifuge abgeschleudert und vom Bodensatz getrennt.

Beim Gebrauch wurde die saure Adsorptionsrestlösung mit Soda bei P_H 6,0 eingestellt und mit der gleichen Volummenge 0,1 Mol Cysteinlösung wie in der angegebenen Weise aktiviert.

Der Bodensatz wurde mit verdünnter Ammoniaklösung unter Umeinstellung bei P_H 7,2 auf 16 ccm ergänzt und 30 Min. lang gut umgerührt. Die in der Zentrifuge abgetrennte Flüssigkeit wurde mit Milchsäure neutralisiert und mit Cystein in 0,05 Mol-Konzentration aktiviert.

Bei einigen Versuchen wurde der abgetrennte Bodensatz einer zweiten Elution unter den gleichen Bedingungen (P_H 8,0) unterzogen (Eluat II).

Adsorptionsansatz: 3,2 ccm Ferrihydroxyd (65,6 mg Fe_2O_3)-, Tierkohle (0,32 g)-, Tonerde (37,8 mg)- oder Kieselgursuspension (0,8 g) + 16 ccm Enzymlösung; bei P_H 4 ausgeführt.

Versuchsansatz: 5 ccm 8%ige Substratlösung + 4 ccm Adsorptionsrestlösung oder Eluat mit 4 ccm 0,1 Mol-Cysteinlösung + 7 ccm Phosphatpuffer + Toluol.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat bei pH 4,5 (ccm 0,1 n -NaOH)

Restlösung					Eluat I (pH 7,2)			Eluat II (pH 8,0)		
Adsorbens	Zeit (Std.)	24	72	120	24	72	120	24	72	120
	Substrate									
Ferri- hydroxyd	Gelatine (Merck)	0,15	0,38	0,36	0	0,06	0,05	0	0,05	— 0,05
	Pepton (Witte)	0,5	0,85	0,98	0,23	0,47	0,55	0,23	0,3	0,35
	Pepton K B	0,26	0,54	0,61	0,2	0,22	0,30	0,21	0,2	0,28
Tierkohle	Gelatine (Merck)	0,02	0,27	0,37	0,02	0,02	0,05	0	0,02	0,03
	Pepton (Witte)	0,42	0,92	0,94	0,27	0,57	0,67	0,23	0,32	0,42
	Pepton K B	0,22	0,67	0,72	0,2	0,4	0,45	0,15	0,32	0,45
Tonerde	Gelatine (Merck)	0,13	0,25	0,35	0,01	0	— 0,02	0,05	0,05	0,03
	Pepton (Witte)	0,46	1,08	1,23	0,01	0,01	0,03	0	0,02	0,02
	Pepton K B	0,3	0,78	0,9	0,06	0,1	0,14	0	0	0,02
Kieselgur	Gelatine (Merck)	0	— 0,05	0,01	0,17	0,42	0,42	—		
	Pepton (Witte)	0	0	— 0,01	0,64	1,15	1,38	—		
	Pepton K B	0,05	0,03	0,08	0,4	0,67	0,82	—		

TABELLE VII-a.

Trennung der ereptase- und kathepsinfreien Kathopeptonase durch Alkali- oder Säureinaktivierung der katheptischen Proteinase (Kathepsin im engeren Sinne).

Hier stand das ereptasefreie Katheptasepräparat zur Verfügung, das aus 1 Teil Leberbrei (Schwein) und 1,5 Volumteilen Wasser bereitet und in der schon beschriebenen Weise durch das Säure-Verfahren (bei pH 4 und 37°C 30 Min.) von der Ereptase befreit wurde. Auf Grund der Ergebnisse in der vorigen Tabelle liess man diese Präparatlösung bei pH 7,7 (mit 3% NaOH) und 37°C 30 Min. lang stehen, um die Kathepsinwirkung (katheptische Proteinase = Kathoproteinase) auszuschliessen und dann mit Aceton-Äther trocknen (Kathopeptonase A). Andererseits wurde die Kathepsinwirkung aus der Präparatlösung durch Aufbewahrung bei pH 3,5 (3% HCl) und 37°C 30 Min. lang ausgeschaltet (Kathopeptonase B). Dieses Enzympräparat hat man mit Aceton

aus der Lösung gefällt und getrocknet.

In den Versuchen wurde eine 10%ige Suspension dieses trocknen Pulvers (A oder B) in Wasser gebraucht.

Versuchsansatz: 5 ccm 8% Substrat-Puffer + 4 ccm Enzymsuspension (0,4 g A oder B) + 4 ccm 0,1 Mol-Cysteinlösung; mit Puffer auf 20 ccm ergänzt und bei PH 4,5 (PH 5,0 für Casein) unter Toluol digeriert. Für Gelatine-Spaltung wurden 2 oder 4 ccm Enzym mit verschiedener Menge Cysteinlösung geprüft. Hier wurde die Gesamtmenge auch auf 20 ccm gebracht.

Aciditätszunahme in 4 ccm Protein-Digestat bei PH 4,5 (ccm 0,1 n-NaOH)								
Substrate	Zeit (Std.)	Kathopeptonase A			Kathopeptonase B			
		24	72	120	24	72	120	
Fibrin		0,04	0	-0,01	0,02	0,02	0,05	
Casein (Hammarsten)		-0,01	0,02	0,01	0,02	-0,01	0,05	
Serumalbumin (Merck)		0,02	0	0	0	0,07	0,22	
Ovoalbumin (Merck)		0,07	0,07	0,08	0	0,01	0	
Gelatine	2 ccm Enzymsuspension (0,2 gr)	0,02	0,02	0,07	-0,02	-0,02	0	
	mit 2 ccm 10/M Cysteinlösung							
	4 ccm Enzymsuspension (0,4 gr)	0	0,02	0,01	0,01	0	0	
	mit 4 ccm 10/M Cysteinlösung							
	4 ccm Enzymsuspension (0,4 gr)	0	0,08	0,07	0	0,03	0,04	
	mit 4 ccm 5/M Cysteinlösung							

TABELLE VII-b.
Ereptasefreie und kathepsinfreie Kathopeptonase-Wirkung.

Enzym: Dieselbe Enzymsuspension A und B in der Tabelle VII-a.
 Versuchsansatz: 5 cem 8%ige Peptonlösung (16%ige Pepton K A-Lösung) oder 0,2 Mol Benzoyldiglycinlösung + 2 oder 4 cem Enzymsuspension A oder B (0,2 oder 0,4 g Präparat A oder B) mit 2 oder 4 cem 0,1 Mol Cysteinlösung; mit Puffer auf 20 cem gebracht und unter Toluol bei PH 4,5 und 37°C digeriert. Zur Versicherung der Inaktivität der Ereptase wurde ein Ansatz bei PH 7,2 ohne Cystein verwendet.

		Aciditätszunahme in 4 cem Digestat (cem 0,1 n-NaOH)									
PH	Enzymmenge Substrate	2 cem (0,2 g) ohne Cystein		2 cem (0,2 g) mit 2 cem 10/M Cystein		4 cem (0,4 g) mit 4 cem 10/M Cystein					
		24	72	120	24	72	120	24	72	120	
4,5 Kathopeptonase A (PH 7,2, 37°C, 30 Min.)	Pepton-Witte	0,07	0,12	0,2	0,19	0,39	0,64	—	—	—	
	Pepton K A	0,03	0,12	0,08	0,03	0,18	0,16	0,01	0,2	0,23	
	Pepton K B	0,05	0,14	0,14	—0,05	0,25	0,35	—	—	—	
	Pepton P	—	—	—	—0,01	0,2	0,35	0,03	0,25	0,35	
	Benzoyldiglycin	0	0	—	—	—	—	—	—	—	
7,2 Kathopeptonase B (PH 3,5, 37°C, 30 Min.)	Pepton-Witte	0	0,05	0,08	—	—	—	—	—	—	
	Pepton-Witte	0,15	0,33	0,38	0,38	0,68	0,98	—	—	—	
	Pepton K A	0	0,04	0,03	0,07	0,1	0	0,05	0,25	0,35	
	Pepton K B	0,12	0,15	0,2	0,14	0,32	0,43	—	—	—	
	Pepton P	0,05	0,12	0,15	0,01	0,13	0,23	0,05	0,3	0,28	
7,2	Benzoyldiglycin	0	0,03	0	—	—	—	—	—	—	
	Pepton-Witte	0,03	0	0,02	—	—	—	—	—	—	



ÜBER DIE AKTIVIERUNG DER TRYPTISCHEN WIRKUNG DES PANKREASSAFTES DES HUNDES.

I. Mitteilung: Säure- und Säure-Cystein-Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.

VON

MASAMITI KAWAHARADA.

*(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Fakultät der
Kaiserlichen Tohoku-Universität (Sendai) und aus dem Utzino-
Laboratorium des Instituts für Chemische Forschungen
an der Kaiserlichen Universität Kyoto.
Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)*

(Eingegangen am 1. Mai 1943)

In den ältesten Angaben über das Aktivieren des inaktiven pankreatischen Trypsins der Pankreasdrüse vertrat Kühne (1867) die Ansicht, dass die inaktive Drüsensubstanz des Hundepankreas bei Digestion mit Säure unter Aufspaltung des aktiven Ferments zerfalle. Darauf erhielt Heidenhain (1875) stark aktive Glycerinextrakte aus gelagerter Pankreasdrüse; er erklärte diese Aktivierung mit der Freilegung des Trypsinogens durch die in den Drüsenzellen auftretende Säure. Diesen Beobachtungen über die „spontane Aktivierung“ in der Drüse wie in Auszügen der Pankreasdrüse standen die Angaben von Schepowalnikow (1899) gegenüber, wonach tryptisch inaktiver Pankreassaft nach Zugabe einer geringen Menge Darmsaft aktiviert wurde, und zwar in alkalischer sowohl als besser noch in neutraler und schwach saurer Lösung. Er schloss auf eine enzymatische Bildung von Trypsin aus einem Zymogen und nannte diesen Aktivator Entero-kinase. Wohlgemuth (1912) verknüpfte die spontane Aktivierung mit den bei der Aufbewahrung in den Drüsensekreten sich abspielenden proteolytischen Prozessen.

In der lehrreichen Abhandlung von Fischer und Abderhalden (1905) sind vergleichende Untersuchungen über Peptidspal-

tung durch den Hundepankreassaft, der spontan oder mit Darmsaft aktiviert wurde, veröffentlicht.

Was die Wirkungsweise der Enterokinase anbelangt, so bestand eine Fermenttheorie, für die sich Schepowalnikow (1899) aussprach, und welche die nachträgliche Bestätigung durch die Beistimmungen vieler Forscher fand (Bayliss u. Starling, 1904, 1905), Meyer (1909–10), Mellanby u. Woolley (1912–13).

Eine andere Ansicht vertraten Hamburger und Hekma (1902), indem sie das Bestehen stoechiometrischer Beziehungen zwischen Aktivator und Enzym annahmen. Zu dieser Auffassung bekannten sich Waldschmidt-Leitz und Mitarbeiter (1924). Sie schlossen auf eine chemische Reaktion im stoechiometrischen Verhältnis zwischen Kinase und Trypsinogen.

Neuerdings haben Northrop und Mitarbeiter (1939) auf einige Fälle von autokatalytischer Aktivierung des kristallinen Trypsinogens ohne Enterokinase hingewiesen. Ihren Angaben nach wurde das kristallinische Trypsinogen autokatalytisch bei pH 7–8 aktiviert, weshalb man inaktives Trypsinogen ohne Aktivierung nicht umzukristallisieren vermochte, da es beim Auflösen in neutraler Flüssigkeit aktiviert wurde; es konnte also als solches erst bei Vorhandensein eines Inhibitors umkristallisiert werden. Diese autokatalytische Aktivierung des Trypsinogens geschah auch in einer nicht stark verdünnten Lösung von MgSO_4 oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Für diese Erscheinung sollte eine geringe Menge aktives Trypsin im Pankreasextrakt verantwortlich sein. Aktives Trypsin wirkte auch aktivierend auf Chymotrypsinogen, und zwar am stärksten bei pH 8. Bei 1 Monat langer Aufbewahrung bei 5°C zeigte das unaktive kristallinische Chymotrypsinogen nur eine sehr schwache spontane Aktivierung, für die eine schwach alkalische wie saure Reaktion günstig zu sein schien. Den Angaben dieser Forscher nach sollte die Aktivierung des Chymotrypsinogens durch aktives Trypsin bei pH 8 mit der Zunahme des Nicht-Protein-Stickstoffs im Trypsin-Chymotrypsinogen-System nicht parallel gehen.

Zuletzt sei hier noch angeführt, dass Kunitz (1938) eine Penicillium-Kinase, mit der man bei pH 3 das Trypsinogen aktivieren konnte, gefunden hat. Diese Penicilliumsubstanz erwies

sich auch als proteolytisch stark aktiv. Auf Grund dieser Beobachtungen hat Northrop (1939) eine Aufspaltung der Peptidkette bei der Aktivierung durch Trypsin oder Penicillium-Kinase angenommen und auf die enzymatischen Vorgänge bei der Trypsinogenaktivierung hingewiesen. Allerdings handelte es sich bei diesen Versuchen stets um die Extrakte von Drüsenzellen, die einen starken Aktivator enthielten; es wäre nun aber von grösstem Wert und Interesse, die Aktivierungsweise des unaktiven Sekre-saftes der Pankreasdrüse kennenzulernen.

In der vorliegenden Arbeit beschäftigte Verf. sich unter Leitung von Prof. Dr. S. Utzino mit dem Studium der sogenannten spontanen Aktivierung des Pankreassaftes und zuerst kamen Bedingungen in Betracht, unter denen ein inaktiver Pankreassaft ohne Kinase-Zusatz spontan tryptisch aktiv werden kann. Den hier versuchten Pankreassaft¹⁾ gewann Verf. aus der einem Hunde angelegten Pankreasfistel nach einer gewissen Mahlzeit und wies auf seine Inaktivität als Kontrolle jedesmal bei Versuchen hin.

Nach 4tägiger Aufbewahrung des unaktiven Pankreassaftes im Eisschrank trat fast keine spontane Aktivierung desselben zutage (Tabelle I). Erst nach langfristiger Aufbewahrung unter Toluol (mehr als 30 Tage) im Eisschrank erfuhr der Saft eine deutliche spontane Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes. Nach 2 Monaten ist der Saft, der sich als ziemlich aktiv erwies, noch durch Enterokinase aktivierbar, obwohl die Aktivitätshöhe deutlich niedriger als diejenige des frischen Saftes war. Im Eisschrank geht also eine spontane Aktivierung des Pankreassaftes sehr langsam vor sich.

Den frischen unaktiven Saft konnte Verf. in inaktivem Zustand im Vakuumexsikkator trocknen, obwohl die Aktivität nach der Kinase-Aktivierung abgeschwächt war (Tabelle II).

Genau wie schon berichtet (Waldschmidt-Leitz et al., 1924 und Itzioka, 1937), blieb der Zusatz von CaCl_2 oder von Galle

1) Herren Prof. Dr. Satake und ausserord. Prof. D. Wada im physiologischen Institut hiesiger Universität ist Verf. für die Anlegung der Pankreasfistel zu herzlichem Dank verpflichtet.

ohne Einfluss auf die Aktivierung des Hunde-Pankreassaftes (Tabelle III).

Nachdem der Saft in einem Kollodiumsäckchen gegen destilliertes Wasser 120 Stunden lang unter Toluol bei Zimmertemperatur dialysiert wurde, zeigte die dialysierte Restlösung, die durch Zentrifugieren vom ausgefällten Niederschlag getrennt wurde, seine tryptische Wirkung fast in einem vollaktiven Zustand, da die Wirkung nicht mehr durch Kinase-Zusatz verstärkt wurde (Tabelle IV). Der Aktivitätsgrad schien aber deutlich schwächer zu sein, als der des nicht dialysierten Saftes. Bei der Dialyse schied sich ein Niederschlag aus, der von der dialysierten Restflüssigkeit getrennt wurde. Die dialysierte Restflüssigkeit, die dem Niederschlag zugesetzt wurde, erfuhr keine Verstärkung. Hier sei besonders betont, dass nach der Dialyse der PH-Wert der dialysierten Restlösung bei PH 5,6 liegt, während der originale Pankreassaft ungefähr PH 9,4 zeigt (Dialysat = PH 7,0). Auf diese Aciditätsverschiebung bei der Dialyse muss man nun als eine Bedingung der spontanen Aktivierung Rücksicht nehmen.

Daraufhin wurden weitere Versuche unter gewissen physikalisch-chemischen Bedingungen ausgeführt, die bei der Aktivierung in Dialyse oder nach langfristiger Aufbewahrung in Frage kommen.

Einfache Schüttelung kam nicht in Frage (Tabelle V).

Um die Frage zu beantworten, ob nicht irgendein Gas wie Kohlensäure oder Luft sich auf die Aktivierung bei der Aufbewahrung oder Dialyse bezieht, wurde hier eine Saftlösung geprüft, die mit Kohlensäure oder Luft bei Zimmertemperatur oder bei 37°C 15 Min. lang durchströmt und etwas sauer besonders durch Kohlensäure-Durchleiten wurde. Diese Behandlungen blieben auch ohne Einfluss auf die Aktivierung (Tabelle VI-A).

Aufbewahrung des Pankreassaftes, der einmal mit Kohlensäure gesättigt war oder aus welchem ein andersmal Kohlensäure nach Ansäuren mit Salzsäure ausgetrieben wurde, im Eisschrank verlied dem Saft keine Aktivierung (Tabelle VI-B).

Nun taucht eine neue Frage auf, wie sich der Saft bei autolytischer Erscheinung verhält. Nach Aufbewahrung des

frischen Saftes bei pH 5–8 und bei 37°C 24 Stunden lang erfuhr der Saft eine Aktivierung, die bei pH 5,5 am stärksten war und einen fast gleichgrossen Wert zeigt, wie bei der Vollaktivierung mit Enterokinase (Tabelle VII-A). Eine Behandlung bei pH 5,5 und bei Zimmertemperatur 24 Stunden lang genügt nicht, um eine vollständige Aktivierung herbeizuführen. Zur Vollaktivierung muss die Aufbewahrung bei pH 5,5 bei Zimmertemperatur länger als 72 Stunden dauern, bei pH 7 noch länger (Tabelle VII-B). Erst nach Behandlung bei 5,5 und bei 37°C über 24 Stunden erfuhr der Saft eine Vollaktivierung, sonst trat die Aktivierung unvollständig auf.

Wurde der Pankreassaft bei saurer Reaktion mit Cysteinlösung (0,05 Mol) bei 37°C 30 Minuten lang vorbehandelt, so trat eine deutliche tryptische Aktivität in einem weiteren pH -Gebiet (pH 5–6) und zwar am stärksten bei pH 5,5 auf, während der nicht mit Cystein behandelte Pankreassaft in dieser Dauerzeit fast keine Aktivierung erfuhr (Tabelle VIII-A). Nach der Säure-Cystein-Behandlung bei pH 5,5 24 Stunden lang trat eine fast vollständige Aktivierung des Saftes auf, die Säure-Aktivierung schien aber unvollständig zu sein (Tabelle VIII-B).

Auf Grund dieser Beobachtung möchte Verf. schliessen, dass die Säure-Cystein-Aktivierung des Saftes bei pH 5,5 und bei 37°C (24 Std. lang) einem fast gleichen Aktivitätsgrad erreichen kann, wie die Kinase-Aktivierung, da unter diesen Bedingungen die Aktivität der tryptischen Wirkung des Saftes fast gleich blieb. Die Säure-Aktivierung bei pH 5,5 und bei 37°C muss noch länger als 24 Stunden dauern, um eine vollständige Aktivierung herbeizuführen.

Wie anorganische Säuren wirkten organische Säuren wie Milchsäure aktivierend auf den Pankreassaft bei pH 5,5 und unter diesen Säuren konnte man keine spezifische Wirkung der Säure auffinden (Tabelle IX).

Bei pH 5,5 wirkte Schwefelwasserstoff nicht besonders stark ein, da die Aktivität der tryptischen Wirkung nur einen schwachen Grad wie bei der Säure-Aktivierung zeigte (Tabelle X). Cyanwasserstoff wirkte vielmehr in hemmendem Sinne (Tabelle X).

Die Pankreas-Mazeration (Hund), welche in kurzfristiger Digestion fast keine oder eine nur schwache Aktivität entfalten konnte, erfuhr nach Aufbewahrung bei $\text{pH } 5$ eine deutliche Aktivierung, wenn auch schwächer als bei Kinase-Aktivierung (Tabelle XI). Hier trat aber die Säure-Cystein-Aktivierung nicht in so ausgeprägtem Grade auf. Da die Behandlung nur eine Stunde lang währte, zeigte die Kinase-Aktivierung immer einen grösseren Wert.

Was nun die Wirkung bei alkalischer Reaktion anbelangt, so erfuhr der Saft bei Aufbewahrung bei alkalischer Reaktion von $\text{pH } 8-11$ im Eisschrank fast keine Aktivierung, wie aus der alkalischen Reaktion des frischen Saftes erwartet, bei $\text{pH } 37^\circ\text{C}$ jedoch nur eine schwache Aktivierung nach 24 Stunden (Tabelle XII-A u. B). Die Aktivität war eine viel schwächere als bei Säure-Aktivierung.

Um in das Wesen der aktivierenden Wirkung bei der Säure- bzw. Säure-Cystein-Aktivierung des Pankreassaftes einzudringen, hat Verf. weiter versucht, die Frage zu klären, ob hier nicht irgend eine enzymologische Erscheinung etwas mit dem Aktivierungsprozess zu tun haben könne. Wie aus dem Autolysenversuche in Tabelle XIII ersichtlich ist, war die Reststickstoff-Zunahme im Autolysat bei $\text{pH } 5,5$ am grössten unter den anderen wie bei $\text{pH } 4$ oder bei $\text{pH } 8$ und in guter Übereinstimmung mit der Autolysenhöhe stand die Aktivität des Pankreassaftes auch am höchsten. Diese Tatsache lässt uns an den Zusammenhang zwischen der Aktivierung und dem Autolysenvorgang des Pankreassaftes denken und hier sei angeführt, dass Kunitz (1938) auf Aktivierung des Kristalltrypsinogens durch Penicillium-Enzym (Proteinase) hingewiesen hatte.

Es ergab sich hier auch, dass Eiweissstoffe des Pankreassaftes, der zur Inaktivierung der Proteinase durch Hitze denaturiert wurde, am stärksten durch Darmmucosa-Mazeration oder Leber-Katheptase als Darmsaft hydrolysiert werden konnten, was auch für die enzymatische angreifbare höhere Stufe der Eiweissstoffe oder Peptonstoffe im Pankreassaft sprechen dürfte (Tabelle XIV). Auf Grund dieser obigen Beobachtungen möchte Verf. mit der

grössten Wahrscheinlichkeit annehmen, dass die sogenannte spontane Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes viel mit der Säure- oder Säure-Cystein-Aktivierung zu tun haben muss und letztere vielleicht in Beziehung mit irgend einem autolytischen Vorgang durch Protease bei P_H 5,5 stehen dürfte, welche vermutlich von katheptischer Natur sein mag.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Eine spontane Aktivierung des inaktiven Pankreassaftes des Hundes fand äusserst langsam im Eisschrank statt und man konnte den inaktiven Saft als solchen im Vakuumexsikkator unter partieller Abschwächung der tryptischen Wirkung nach der Kinaseaktivierung trocknen. Calciumchlorid wie Galle zeigten keine den Saft aktivierende Wirkung.

2. Nach Dialyse wurde der inaktive Pankreassaft wirksam; wobei sich die alkalische Reaktion (P_H 9) des originalen Saftes nach der sauren Seite von P_H 5,6 verschob. Einfaches Schütteln des Saftes oder Durchströmen der Luft oder Kohlensäure bewirkte keine Aktivierung.

3. Bei Aufbewahrung des Saftes bei $37^\circ C$ erfuhr dieser in dem P_H -Bereich von P_H 5-8 eine Aktivierung, und zwar am stärksten bei P_H 5,5. Diese aktivierende Wirkung wurde durch Cysteinzusatz deutlich gefördert. Bei Aufbewahrung bei P_H 5,5 und bei $37^\circ C$ 72 Stunden lang schien der Saft fast vollständig aktiviert zu werden, da er durch Kinase nicht mehr aktiviert wurde. Nach Cysteinzusatz zeigte der Saft eine solche Aktivität schon nach 24stündiger Aufbewahrung bei P_H 5,5. Danach möchte Verf. eine Säure- oder Säure-Cystein-Aktivierung des Saftes annehmen. Organische wie anorganische Säuren besitzen fast den gleichen Wert für die Säure-Aktivierung; Schwefelwasserstoff wirkte ebenfalls fördernd, Cyanwasserstoff aber im hemmenden Sinne.

4. Die Zunahme des Reststickstoffs im Autolysat des Saftes bei Aufbewahrung bei $37^\circ C$ unter Toluol war bei P_H 5,5 am stärksten, indem zugleich auch die Aktivierung am grössten war. Darauf hin ist Verf. geneigt, diese Säure- und Säure-Cystein-Aktivierung bei P_H 5,5 durch irgend eine Protease-Wirkung

katheptischer Natur zu erklären.

Dem Unterrichtsministerium sei an dieser Stelle bestens gedankt für die Gewährung einer Unterstützung zur Anregung wissenschaftlicher Forschung.

Prof. Dr. S. Utzino.

LITERATUR.

- Bayliss, W. M. u. Starling, E. H. (1904/1905): Journ. Physiol., **30**, 6;
32, 129.
Fischer, E. u. Abderhalden, E. (1902): **46**, 52.
Heidenhain, R. (1875): Pflügers Arch., **10**, 557.
Hamburger, J. u. Hekma, E. (1902): Journ. Physiol. et Pathol. gèn.,
4, 805.
Itzioka, F. (1937): Dieses Journ., **26**, 37 u. 81.
Kühne, W. (1867): Arch. Anat. u. Physiol., **39**, 130.
Kunitz, M. (1938): Journ. gen. Physiol., **21**, 601.
Meyer, K. (1909–10): Bioch. Zeits., **23**, 68.
Mellanby, J. u. Woolley, V. J. (1912–13): Journ. Physiol., **45**, 370.
Northrop, J. H. (1939): Crystalline Enzymes, New York.
Schepowalnikow, N. P. (1899): Malys Jahresber., **29**, 378.
Utzino, S. u. Sakai, T. (1941): Dieses Journ., **33**, 457.
Wohlgemuth, J. (1912): Bioch. Zeits., **39**, 302.
Waldschmidt-Leitz, E. (1924): Zeits. physiol. Chem., **132**, 181.

Versuchsteil.

TABELLE I.

Spontane Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes bei Aufbewahrung unter Toluol im Eisschrank.

Nach Aufbewahrung des frischen Pankreassaftes, der aus einer einem Hunde angelegten Pankreasfistel nach der Mahlzeit von Reis-Fleisch und Milch gewonnen wurde, unter Toluol im Eisschrank pipettierte man eine gewisse Menge Saft ab, um ihn auf seine Trypsin-Aktivität hin zu prüfen. Bei den Versuchen wurden 3 ccm Saftlösung verwendet, nachdem 1 ccm Saft mit 9 ccm Wasser verdünnt worden war.

Zur Kinase-Aktivierung wurde je 1 ccm Saft mit 0,05 g Kinasepulver*) in 9 ccm Wasser versetzt und bei 37°C 30 Minuten lang stehen gelassen.

Versuchsansatz: 20 ccm 1% ige Kaseinpufferlösung wurden mit 3 ccm Saftlösung (1:10) vermischt und das Gemisch mit Puffer, unter Einstellung bei PH 7,5, auf 25 ccm gebracht. Den Ansatz liess man unter Toluol bei 37°C digerieren und bestimmte die Acidität in 5 ccm Digestat nach Sörensen. Nach Abzug der Kontrollwerte wurden die korrigierten Werte der Aciditätszunahme in den Hauptversuchen in der Tabelle angegeben.

Um die Aktivität des Pankreassaftes, der vier Tage lang im Eisschrank aufbewahrt worden war, zu prüfen, wurden hier 1,5 ccm Saftlösung (1:10) anstatt 3 ccm in den Versuchen verwendet, die sonst unter den gleichen Bedingungen wie die in Tabelle I ausgeführt wurden.

Aciditätszunahme in 5 ccm Digestat nach 3, 8 und 24 Stunden: vor der Aufbewahrung a) ohne Kinase 0,05, 0,01 und 0,09; mit Kinase 0,26, 0,44 und 0,49; nach der Aufbewahrung b) ohne Kinase 0,03, 0,05 und 0,09; mit Kinase 0,33, 0,4 und 0,49 ccm 0,1 n-NaOH respektive.

Über die Eigenschaften des hier gebrauchten Kinasepulvers, das aus Dünndarmmucosa bereitet wurde und sich als ereptisch wie tryptisch inaktiv erwies, wird Verf. eingehend in einer der folgenden Abhandlungen berichten.

Aktivierung	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei PH 7,5 (ccm 0,1 n-NaOH)							
	Zeit (Std.n.)	Aufbewahrungszeit						
		1 Tag	15 Tage	30 Tage	60 Tage	120 Tage	182 Tage	365 Tage
Ohne Kinasepulver	5	0	0	0,15	0,19	0,37	0,46	0,56
	24	0,09	0,17	0,36	0,49	0,65	0,7	0,77
	72	0,26	0,43	0,58	0,68	0,83	0,85	0,89
Mit Kinasepulver*) (0,05 g)	5	0,98	0,8	0,76	0,73	0,73	0,7	0,61
	24	1,19	0,99	0,89	0,92	0,98	0,9	0,83
	72	1,26	1,08	1,06	1,04	1,06	1,0	0,93

*) Vergl. dazu die Beschreibung in der nächsten Abhandlung dieser Arbeit.

TABELLE II.

Einfluss der Trocknung im Vakuum-Exsikkator auf die Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.

Nachdem man den frischen Pankreassaft im Vakuum-Exsikkator 15 Tage lang getrocknet hatte, wurde die Trockenmasse mit Wasser auf das originale Volumen gebracht und geprüft. Bei den Versuchen gelangten 3 ccm einer mit Wasser aufs 10fache verdünnten Saftlösung zur Verwendung.

Zur Aktivierung wurde 1 ccm Saft mit 0,05–0,1 g Kinasepulver in 9 ccm Wasser versetzt und bei 37°C 30 Minuten lang aufbewahrt.

Versuchsansatz: Ebenso wie in Tabelle I.

Zeit (Std.n.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)								
	Ohne Kinase	Mit 0,05 g Kinasepulver				Mit 0,1 g Kinasepulver			
	PH	Digestions-PH				Digestions-PH			
	7,5	7	7,5	8	8,5	7	7,5	8	8,5
3	0	0,52	0,45	0,43	0,36	0,4	0,43	0,38	0,41
8	0,02	0,62	0,6	0,62	0,52	0,55	0,59	0,54	0,53
24	0,13	0,76	0,77	0,74	0,61	0,68	0,73	0,62	0,69

TABELLE III.

Einfluss des CaCl_2 und der Galle auf die Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.

Als Enzym benutzte man je 3 cem Gemisch, das aus 1 cem Pankreassaft, 4 cem Wasser und 5 cem CaCl_2 -Lösung von verschiedenen Mol-Konzentrationen bestand, nachdem das Gemisch bei 37°C 30 Minuten lang aufbewahrt worden war.

In den Versuchen kamen je 3 cem Enzym-Galle-Gemisch zur Anwendung, das 1 cem Pankreassaft und eine bestimmte Menge Rindergalle in 10 cem wässriger Lösung enthielt und bei 37°C 30 Minuten lang aufbewahrt worden war.

Versuchsansatz: Ebenso wie in Tabelle I.

Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei P_H 7,5 (cem 0,1 $n\text{-NaOH}$)													
Zeit (Stdn.)	Mol-Konzentration von CaCl_2 in 10 cem Enzym- CaCl_2 -Gemisch						Gallenmenge (cem) in 10 cem Saft-Galle-Gemisch						
	0		$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{5}$	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0
	Ohne Kinase	Mit Kinase											
3	0,03	0,3	0	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	-0,03	-0,03	0,03	-0,02	-0,01
8	0,02	0,4	-0,02	-0,02	-0,01	0,02	0,01	0	0	0	0,02	-0,01	-0,01
24	0,09	0,54	0,07	0,07	0,09	0,1	0,1	0,08	0,08	0,04	0,09	0,06	0,08

TABELLE IV.

Einfluss der Dialyse (120 Stdn.) auf die Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.

Dialyse: 10 ccm frischer inaktiver Pankreassaft wurden in einem Kollodiumsäckchen bei Zimmertemperatur 120 Stunden lang gegen destilliertes Wasser dialysiert, welches täglich zweimal erneuert wurde. Das Gesamt-Dialysat (pH 7,0) hat man auf dem Wasserbade unter 40°C mittels eines Föns bis auf ca. 20 ccm abgedampft und auf seine Wirkung hin geprüft (b und d).

Den dialysierten Pankreassaft, der nach der Dialyse ca. 14 ccm betrug und einen weisslichen Niederschlag bildete, brachte man mit destilliertem Wasser genau auf 20 ccm. In Versuch I wurde der Niederschlag abzentrifugiert und die obere Restlösung ohne diesen verwendet, während die Gesamtrestlösung mit dem Niederschlag in Versuch II geprüft wurde.

Hier sei besonders erwähnt, dass der Pankreassaft, der vor der Dialyse einen pH -Wert von 9,4 zeigte, nach der Dialyse schwach sauer (pH 5,6) wurde.

Aktivierung: Kontrolle) 1 ccm Pankreassaft + 9 ccm Wasser mit od. ohne 0,05 g Kinasepulver; a und c) 2 ccm dialysierter, verdünnter Pankreassaft (= 1 ccm Pankreassaft) + 8 ccm Wasser mit od. ohne 0,05 g Kinase; b und d) 2 ccm dialys. verd. Pankreassaft + 2 ccm Dialysat + 6 ccm Wasser mit od. ohne 0,05 g Kinase. Jedes Gemisch wurde bei 37°C 30 Min. lang aufbewahrt und dann je 3 ccm nach dem Erkalten als Enzym dem Versuchsansatz hinzugefügt.

Versuchsansatz: 20 ccm 1%ige Kasein (Hammarsten)-Citratpufferlösung + 3 ccm Enzymlösung, mit Citratpuffer auf 25 ccm gebracht (pH 8,0) und bei 37°C unter Toluol digeriert. Allgemeine Kontrolle: Enzym-Pufferlösung ohne Substrat. Die korrigierten Werte der Aciditätszunahme finden sich in der Tabelle angegeben.

Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei $\text{pH } 8$ (cem $0,1 \text{ n-NaOH}$)												
Zeit (Stdh.)	I) Dialys. Pankreassaft ohne Niederschlag						II) Dialys. Pankreassaft mit Niederschlag				Kontrolle (Ohne Dialyse)	
	a) Ohne Dialysat		b) Mit Dialysat		c) Ohne Dialysat		d) Mit Dialysat		Ohne Kinase	Mit 0,05 g Kinasepulver	Mit Säure-Cystein (37°C 24 Stdh.)	
	Ohne Kinase	Mit Kinasepulver	Ohne Kinase	Mit Kinasepulver	Ohne Kinase	Mit Kinasepulver	Ohne Kinase	Mit Kinasepulver				
	5	0,3	0,18	0,31	0,2	0,58	0,51	0,6	0,52	0	0,9	0,72
24	0,65	0,55	0,65	0,6	0,82	0,8	0,9	0,8	0,09	1,03	0,9	
72	0,78	0,71	0,85	0,79	0,95	0,91	1,01	0,97	0,24	1,11	1,09	

TABELLE V.

*Einfluss der Schüttelung auf die Aktivierung der tryptischen
Wirkung des Pankreassaftes.*

Den Pankreassaft, der im Eisschrank 3 Tage lang unter Toluol aufbewahrt worden war, schüttelte man in einem Schüttelapparate 8 Stunden lang und prüfte auf seine Aktivität hin in der schon angegebenen Weise.

Versuchsansatz: Kaseinspaltung bei P_H 7,5 wie in Tabelle I.

Zeit (Stdn.)	Aciditätszunahme in 5 cem Digestat bei P_H 7,5 (cem 0,1 n-NaOH)		
	Kontrolle		Nach der Schüttelung Ohne Kinase
	Ohne Kinase	Mit Kinase	
3	0,01	0,34	0
8	-0,02	0,43	-0,01
24	0,09	0,55	0,05

TABELLE VI-A.

*Einfluss der CO_2 - oder der Luft-Durchleitung auf die
Aktivierung der tryptischen Wirkung des
Pankreassaftes.*

3 cem Pankreassaft verdünnte man mit Wasser auf 30 cem (=also 10fach) und leitete durch die Enzymlösung einen CO_2 - oder Luftstrom 15 Minuten lang bei Zimmertemperatur oder bei $37^\circ C$ hindurch; der P_H -Wert der Saftlösung betrug ungefähr P_H 9 vor der Gas-Durchleitung, wurde aber P_H 6,6 bzw. P_H 8,8 nach der Gas-Behandlung. Nach dieser Behandlung wurden je 3 cem Saft-Lösung (10fach verdünnt) auf ihre Aktivität hin geprüft.

Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei P _H 8 (cem 0,1 n-NaOH)							
Temperatur bei Gas- Durchleitung	Zeit (Std.n.)	Gas					
		Nicht behandelt		CO ₂		Luft	
		Aktivierung		Aktivierung		Aktivierung	
		Ohne Kinase- pulver	Mit Kinase- pulver	Ohne Kinase- pulver	Mit Kinase- pulver	Ohne Kinase- pulver	Mit Kinase- pulver
Zimmer- temperatur (16°C)	5	0	0,85	0	0,69	0	0,72
	24	0,02	0,97	0,05	0,83	0	0,87
	72	0,24	1,07	0,25	0,93	0,18	0,96
37°C	5	0	1,01	0,02	0,89	0	0,99
	24	0,09	1,19	0,08	1,06	0,06	1,14
	72	0,29	1,24	0,19	1,08	0,18	1,18

TABELLE VI-B.

*Einfluss des CO₂-Gases auf die Aktivierung der tryptischen
Wirkung des Pankreassaftes.*

Einerseits liess man CO₂-Gas durch die aufs 10fache verdünnte Pankreassaftlösung 15 Minuten lang durchströmen. Nachdem sich der P_H-Wert, der sich nach der CO₂-Durchleitung bei P_H 7,2 verschoben hatte, mit 10%iger Natronlauge zu seinem originalen Wert (P_H 9) wieder hergestellt hatte, bewahrte man diese Saftlösung im Eisschrank auf.

Andererseits wurde der Pankreassaft zur Aufbewahrung fortgestellt, nachdem man vorher durch Ansäuern (P_H 5,5) mit 10%iger Salzsäure und durch starkes Umrühren eine möglichst grosse Menge Kohlensäure aus dem Saft, der eine reichliche Menge Bicarbonat enthielt, hatte entweichen lassen und der P_H-Wert des einmal sauer gemachten Saftes wieder P_H 9 erreicht hatte.

Versuchsansatz: Ebenso wie in Tabelle I.

Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei P_H 7,5 (cem 0,1 n-NaOH)

Aufbewahrungsdauer im Eisschrank	Zeit (Std.)	Behandlung					
		Nicht behandelt		Nach CO ₂ -Austreiben		Nach CO ₂ -Durchleiten	
		Aktivierung		Aktivierung		Aktivierung	
		Ohne Kinase- pulver	Mit Kinase- pulver	Ohne Kinase- pulver	Mit Kinase- pulver	Ohne Kinase- pulver	Mit Kinase- pulver
Sofort	5	0	0,8	0	0,56	0	0,8
	24	0,03	0,98	0	0,72	0	0,99
	72	0,14	1,08	0,07	0,86	0,13	1,09
4 Tage	5	0	0,7	0	0,48	0	0,69
	24	0	1,0	0	0,69	0	0,98
	72	0,19	1,1	0,1	0,8	0,2	1,09
10 Tage	5	0	0,6	0	0,49	0	0,8
	24	0,08	0,97	0,07	0,69	0,1	1,0
	72	0,27	1,07	0,12	0,81	0,2	1,11
20 Tage	5	0,07	0,76	0,06	0,51	0,07	0,8
	24	0,13	1,01	0,11	0,7	0,11	0,98
	72	0,39	1,1	0,29	0,8	0,31	1,1
30 Tage	5	0,1	0,75	0,1	0,52	0,08	0,8
	24	0,21	1,0	0,29	0,71	0,21	0,95
	72	0,44	1,07	0,47	0,82	0,48	1,08

TABELLE VII-A.

Einfluss der PH-Werte auf die Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.

Vor der Digestion wurde je 1 ccm frischer Pankreassaft unter Einstellung bei PH 2-8 mittels 0,1 n-HCl oder 0,1 n-NaOH mit Wasser auf 10 ccm gebracht und unter Toluol bei 37°C 30 Minuten oder 24 Stunden lang stehen gelassen. Je 3 ccm dieser Saftlösung verwendete man nach Einstellung bei PH 8 mittels 0,1 n-NaOH in den Digestionsversuchen bei eben diesem PH.

Digestionsansatz: 3 ccm Saftlösung + 20 ccm 1%ige Kasein-Pufferlösung, mit Puffer auf 25 ccm gebracht und bei PH 8 bei 37°C unter Toluol digeriert. Kontrolle mit Saftlösung-Puffer ohne Kasein. Die Kinaseaktivierung geschah ebenso wie in Tabelle I.

Behandlungsdauer	Zeit (Stdn.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei PH 8 (ccm 0,1 n-NaOH)									
		PH-Werte bei Vorbehandlung								Pankreassaft ohne Behandlung	
		2	3	4	4,5	5	5,5	6	7	8	Mit Kinasepulver (0,05 g)
30 Minuten	5	0	0	0	0	0,02	0,03	0	0	0	0,88
	24	0	0	0	0	0,1	0,1	0,07	0,07	0,05	1,04
	72	0,11	0,13	0,14	0,17	0,24	0,32	0,2	0,19	0,18	1,09
24 Stunden	5	0	0	0	0,08	0,16	0,7	0,22	0,19	0,19	—
	24	0	0	0	0,19	0,34	0,82	0,52	0,46	0,48	—
	72	0	0	0,02	0,32	0,64	0,95	0,72	0,68	0,69	—

TABELLE VII-B.

Säure-Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes bei Zimmertemperatur (16°C).

10 ccm Pankreassaft wurden mit 10%iger Salzsäure und Wasser unter Einstellung bei PH 5,5, 6,0 und 7,0 auf 20 ccm gebracht und bei Zimmertemperatur (16°C) unter einer Toluolschicht eine gewisse Zeit lang aufbewahrt. Beim Gebrauch verdünnte man diese Lösung mit Wasser bis auf die doppelte Menge und benutzte dann je 3 ccm dieser Lösung.

Versuchsansatz: Ebenso wie in der vorigen Tabelle.

Behandlungs- PH-Werte	Zeit (Std.n.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei PH 8 (ccm 0,1 n-NaOH)					
		Aufbewahrung bei Zimmertemperatur					
		Sofort	1 Tag	3 Tage	5 Tage	7 Tage	Kontrolle
		Kinase-Aktivierung					
		Ohne Kinase	Ohne Kinase	Ohne Kinase	Ohne Kinase	Ohne Kinase	Mit Kinase
PH 5,5	5	0	0,06	0,73	0,81	0,81	0,8
	24	0,05	0,13	0,9	1,0	0,99	0,99
	72	0,2	0,38	0,95	1,13	1,08	1,07
PH 6	5	0	0,02	0,73	0,80	0,68	0,65
	24	0,05	0,12	0,9	1,01	0,89	0,81
	72	0,2	0,36	0,94	1,12	0,93	0,93
PH 7	5	0	0	0,03	0,14	0,17	0,86
	24	0,05	0,1	0,12	0,42	0,5	1,01
	72	0,2	0,37	0,50	0,69	0,67	1,07

TABELLE VIII-A.

Einfluss des Cysteins auf die Säure-Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.

Um den Einfluss des Cysteins zu prüfen, liess man 1 ccm Pankreassaft mit 1 ccm 0,1 Mol-Cystein-HCl-Lösung (neutralisiert) und 8 ccm Wasser einerseits oder 1 ccm Pankreassaft mit 9 ccm

Wasser ohne Cystein als Kontrolle andererseits bei verschiedenen PH-Werten (PH 5–6) bei 37°C 30 Minuten oder 24 Stunden lang stehen. Von dieser Mischung kamen je 3 ccm Saftlösung in den Versuchen zur Anwendung. Zum Vergleichszweck wurde die Aktivität des mit Kinase behandelten Saftes geprüft.

Versuchsansatz: Ebenso wie in Tabelle I.

Behandlungsdauer	Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei PH 8 (ccm 0,1 n-NaOH)							
		Ohne Cystein			Mit Cystein			Kontrolle	
		PH-Werte			PH-Werte			Ohne Kinase	Mit Kinasepulver (0,05 g)
		5	5,5	6	5	5,5	6		
30 Minuten	5	0,02	0,04	0,03	0	0,2	0,09	0	0,85
	24	0,1	0,13	0,11	0,09	0,51	0,36	0,08	1,02
	72	0,24	0,32	0,28	0,23	0,74	0,61	0,23	1,08
24 Stunden	5	0,12	0,69	0,21	0,46	0,75	0,6	—	—
	24	0,32	0,8	0,51	0,65	0,94	0,8	—	—
	72	0,51	0,94	0,69	0,76	1,12	0,99	—	—

TABELLE VIII-B.

Einfluss des Cysteins auf die Säure-Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.

Bei den Hauptversuchen wurden 3 ccm Saft mit 4,5 ccm 0,1 Mol-Cysteinlösung durch einen regulierenden Zusatz von 0,1 n-HCl, 0,1 n-NaOH und Wasser unter Einstellung bei verschiedenen PH-Werten auf 9 ccm gebracht und bei 37°C 30 Minuten oder 24 Stunden lang aufbewahrt.

Zu Vergleichszwecken wurde der Saft nach 3facher Verdünnung mit Wasser ohne Cysteinzusatz bei den angegebenen PH-Werten bei 37°C 30 Min. oder 24 Stunden lang aufbewahrt.

Um die Vollaktivität des Kontrollversuchs anzuzeigen, wurden entweder 2 ccm Saft mit 0,1 g Enterokinasepulver in 4 ccm Wasser einerseits oder 4 ccm eines schon mit Cystein bei PH 5,5 aufbewahrten, aufs 3fache verdünnten Saftes mit 0,08 g Kinasepulver nach der Einstellung bei PH 8 bei 37°C 30 Min. stehen gelassen. Je 3 ccm dieser Saftlösung kamen zur Anwendung.

Versuchsansatz: Ebenso wie in der vorigen Tabelle.

Zusatz	Behandlungsdauer bei 37° C	Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei pH 8 (cem 0,1 n-NaOH)					pH-Werte bei der Behandlung mit oder ohne Cystein							
			Kontrolle (nicht behandelt)			2	3	4	4,5	5	5,5		6	7	8
			Ohne Kinasepulver	Mit Kinasepulver (pH 8, 30° C, 30 Min.)	Mit Cystein (pH 5,5 37° C, 24 Std.)						Ohne Kinase- pulver	Mit Kinase- pulver			
Ohne Cystein	30 Min.	5	0	0,88	—	0	0	0	0	0	0,03	—	0	0	0
		24	0,05	1,0	—	0	0	0	0	0,08	0,1	—	0,07	0,07	0,05
		72	0,17	1,15	—	0,03	0,05	0,08	0,1	0,23	0,3	—	0,2	0,2	0,18
Ohne Cystein	24 Std.	5	—	—	0,73	0	0	0	0,09	0,16	0,48	0,75	0,26	0,22	0,20
		24	—	—	0,9	0	0	0	0,21	0,38	0,76	0,92	0,66	0,47	0,45
		72	—	—	1,05	0	0,07	0,08	0,39	0,61	1,0	1,12	0,84	0,71	0,7
Mit Cystein	30 Min.	5	0	0,89	—	0	0	0	0	0	0,1	—	0	0	0
		24	0,05	1,05	—	0	0	0	0,1	0,1	0,32	—	0,08	0,06	0,05
		72	0,25	1,2	—	0	0	0	0,3	0,37	0,57	—	0,38	0,3	0,27
Mit Cystein	24 Std.	5	—	—	—	0	0	0	0,19	0,4	0,75	0,75	0,51	0,46	0,34
		24	—	—	—	0	0	0	0,29	0,61	0,95	0,94	0,72	0,66	0,68
		72	—	—	—	0	0	0	0,4	0,82	1,1	1,14	0,89	0,82	0,82

TABELLE IX.

*Einfluss der anorganischen und organischen Säuren auf die
Säure-Aktivierung der tryptischen Wirkung
des Pankreassaftes (Hund).*

Je 2 ccm Pankreassaft wurden unter Einstellung bei P_H 5,5 mit Säure und Wasser auf 20 ccm gebracht und bei $37^\circ C$ 24 Stunden lang aufbewahrt.

Für die Cystein-Aktivierung wurden 2 ccm Saft mit 2 ccm 0,1 Mol-Cysteinlösung bei P_H 5,5 (HCl) bei $37^\circ C$ 60 Minuten lang gehalten, dann mit Wasser auf 20 ccm gebracht und weiter bei $37^\circ C$ 23 Stunden lang unter Toluol aufbewahrt.

Zur Kinase-Aktivierung wurden 0,05 g Kinasepulver in 9 ccm Wasser mit je 1 ccm Saft versetzt und bei $37^\circ C$ 30 Minuten lang stehen gelassen.

Versuchsansatz: Ebenso wie in Tabelle I.

Zeit (Std.n.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei P_H 8 (ccm 0,1 n-NaOH)									
	Kontrolle			Säurearten (P_H 5,5)						
	Ohne Kinase- pulver	Mit Kinase- pulver	Mit Cystein	Milch- säure	Essig- säure	Mono- chlor- essig- säure	Monojod- essig- säure	Salzsäure	Schwefel- säure	Salpeter- säure
5	0	0,82	0,65	0,56	0,5	0,54	0,57	0,38	0,38	0,36
24	0,05	1,01	0,84	0,86	0,82	0,85	0,86	0,69	0,71	0,6
72	0,25	1,15	1,02	1,03	0,97	1,03	0,99	0,88	0,89	0,87

TABELLE XI.
Einfluss des P_H -Wertes und des Cysteininzusatzes auf die tryptische Wirkung der Pankreasmazeration des Hundes.

Die Pankreasmazeration, die aus 1 Teil Pankreasbrei (Hund) und 3 Teilen Glycerin-Wasser (1:1) bestand, wurde mit Gaze kolliert. Um den Mazerationssaft möglichst im inaktiven Zustand zu gewinnen, wurde starkes Zerreiben wie Umrühren vermieden, indem man Drüsengewebe in Glycerin-Wasser vorsichtig zerdrückte, um die Enzymkomponente in Lösung zu bringen. Je 2 cem Mazeration wurden entweder mit 2 cem Wasser oder mit 0,04 g Cystein in 2 cem Wasser bei verschiedenen P_H -Werten, wie in der Tabelle, bei 37°C eine Stunde lang aufbewahrt. Für die Kinase-Aktivierung behandelte man 2 cem Mazeration mit 0,06 g Kinasepulver in 2 cem Wasser bei P_H 8 und bei 37°C 30 Minuten lang. In den Versuchen wurden dann je 2 cem (8fach) verdünnte Pankreasmazeration verwendet. Versuchsansatz: 20 cem 1% Kaseinlösung + 2 cem Mazeration + 3 cem Puffer.

Aktivierung (37°C, 1 Stdn.)	Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei P_H 8 (cem 0,1 n-NaOH)										
	PH-Werte bei Aufbewahrung								Pankreasmazeration ohne Aufbewahrung		
	2	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	7	8	Mit Kinasepulver 0,03 g
Ohne Cystein	0	0	0	0,04	0,14	0,47	0,07	0,05	0,07	0,06	0,92
	0	0	0,04	0,12	0,39	0,88	0,37	0,15	0,19	0,14	1,2
	0,06	0,08	0,23	0,41	0,67	1,08	0,91	0,72	0,7	0,6	1,35
Mit Cystein	0	0	0	0,07	0,49	0,28	0,08	0,07	0,05	0,05	—
	0	0	0	0,19	0,92	0,72	0,31	0,28	0,16	0,16	—
	0	0	0,1	0,36	1,14	0,94	0,81	0,79	0,66	0,65	—

TABELLE XII-A.

Einfluss des alkalischen Mediums auf die Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes bei der Aufbewahrung im Eisschrank.

Den Saft bewahrte man im Eisschrank 20 Tage lang auf, nachdem er unter Einstellung bei P_H 8–11 mittels 10%iger Salzsäure oder Natronlauge sowie mit Wasser aufs doppelte verdünnt worden war.

Der frische Pankreassaft zeigte ungefähr P_H 9.

Versuchsansatz: 20 cem 1% Kaseinlösung + 3 cem Saftlösung (1:10) + 2 cem Puffer.

Aufbewahrung im Eisschrank (Tage)	Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei P_H 8 (cem 0,1 n) NaOH						
	Zeit (Std.)	P_H -Werte bei der Aufbewahrung.					
		8	9	9,5	10	10,5	11
Sofort	5	—	0	—	—	—	—
	24	—	0,07	—	—	—	—
	72	—	0,19	—	—	—	—
1	5	0,09	0,08	0,03	0,01	0	0
	24	0,12	0,1	0,1	0,09	0	0
	72	0,3	0,23	0,21	0,18	0,1	0,02
10	5	0,08	0,09	0,1	0,09	0,09	0,09
	24	0,19	0,19	0,2	0,19	0,19	0,19
	72	0,52	0,5	0,51	0,5	0,5	0,49
20	5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,09
	24	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,22
	72	0,59	0,52	0,52	0,51	0,51	0,49

TABELLE XII-B.

Einfluss der Temperatur auf die Aktivierung der tryptischen Wirkung im alkalischen Medium (24 Std.).

Hier wurde der Pankreassaft unter Einstellung bei alkalischer

Reaktion (PH 8–11) bei 37°C oder im Eisschrank 24 Stunden lang aufbewahrt. In den Versuchen kamen 3 ccm einer aufs 10fache verdünnten Enzymlösung zur Anwendung.

Der PH-Wert des frischen Saftes betrug ungefähr PH 9.

Versuchsansatz: Ebenso wie in Tabelle I.

Aufbewah- rungs- temperatur	Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei PH 8 (ccm 0,1 n-NaOH)							
		PH-Werte bei der Aufbewahrung						Pankreassaft ohne Behandlung (Kontrolle)	
		8	9	9,5	10	10,5	11		
Eisschrank (24 Std.)	5	0,09	0,08	0,03	0,01	0	0	0	0
	24	0,12	0,1	0,1	0,09	0	0	0,07	0,1
	72	0,3	0,23	0,21	0,18	0,1	0,02	0,19	0,25
37°C (24 Std.)	5	0,22	0,22	0,22	0,21	0,16	0,08	—	—
	24	0,45	0,43	0,42	0,41	0,24	0,1	—	—
	72	0,71	0,7	0,68	0,6	0,4	0,26	—	—

TABELLE XII.

Autolyse des frischen inaktiven Pankreassaftes (Hund) bei verschiedenen PH-Werten und die tryptisch aktive Wirkung des Autolysats.

Je 4 ccm inaktiver Pankreassaft wurden mit Wasser und 10%iger Salzsäure unter Einstellung bei PH 4, 5,5, 6 und 8 auf 40 ccm gebracht und unter Toluol bei 37°C 24 Stunden lang autolytisiert. Durch Zusatz von 5 ccm 10%iger Trichloressigsäurelösung wurde eine Proteinfraktion aus 10 ccm Autolysat ausgefällt, abgeschleudert und abfiltriert. Die Menge des Reststickstoffs in 10 ccm Filtrat ermittelte man nach Kjeldahl.

Zur Prüfung der tryptisch aktiven Wirkung dieses bei verschiedenen PH-Werten autolytierten Saftes wurden 3 ccm eines aufs 10fache verdünnten Saftes in den Versuchen mit 20 ccm 1%iger Kasein(Hammarsten)-Lösung und 2 ccm Puffer bei PH 8 digeriert.

Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne Kasein.

Die korrigierten Werte der Rest-N-Zunahme und Aciditätszunahme sind in der Tabelle angegeben.

Zeit (Stdn.)	Rest-N-Zunahme in 10 cem Pankreassaft- Autolysat (mg)			
	PH-Werte des Saftes bei der Autolyse			
	PH 4	PH 5,5	PH 6	PH 8
Sofort	0,126	0,134	0,134	0,143
24	0,151	0,63	0,521	0,479
Zunahme	0,025	0,496	0,387	0,336

Zeit (Stdn.)	Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei PH 8 (cem 0,1 n-NaOH)			
	PH 4	PH 5,5	PH 6	PH 8
5	0	0,38	0,2	0,11
24	0	0,72	0,56	0,32
72	0,05	1,01	0,76	0,52

TABELLE XIV.

*Spaltung des erhitzten Pankreassaftes (70°C, 30 Min.) durch
Darmsaft (Hund), Dünndarmschleimhautmazeration
(Schwein) und ereptasefreie Leber-
Katheptase (Schwein).*

Zu 10 cem Pankreassaft, der vorher zur Inaktivierung der Pankreasproteasen bei 70°C 30 Min. lang erhitzt wurde, fügte man entweder 2 cem Darmsaft oder 1 cem Mucosamazeration des Dünndarms (Mucosabrei: Glycerin-Wasser=1:3) oder 8 cem ereptasefreie Leberpulver-Suspension [0,4 g Leberpulver (Utzino und Sakai, 1941) + 4 cem H₂O + 4 cem 0,1 Mol-Cysteinlösung, aktiviert bei PH 6, 37°C, 30 Min.] hinzu und brachte die Gesamtmenge mit Citratpuffer auf 25 cem, indem die Reaktion der Lösung bei PH 7,8, oder 4,5 respektive eingestellt wurde. Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne erhitzten Pankreassaft.

Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 5 cem Digestat (cem 0,1 n-NaOH)		
	Enzymarten		
	Darmsaft PH 7,8	Dünndarmschleimhaut- mazeration PH 7,8	Leber-Katheptase (ereptasefrei) PH 4,5
24	0,17	1,18	0,29
72	0,2	1,31	0,55
120	0,22	1,65	0,6

ÜBER DIE AKTIVIERUNG DER TRYPTISCHEN WIRKUNG DES PANKREASSAFTES DES HUNDES.

II. Mitteilung: Beiträge zur Kenntnis der Kinase- Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.

VON

MASAMITI KAWAHARADA.

*(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Fakultät der
Kaiserlichen Tohoku-Universität (Sendai) und aus dem Utzino-
Laboratorium des Instituts für die Chemische Forschung
der Kaiserlichen Universität Kyoto. Direktor:
Prof. Dr. S. Utzino.)*

(Eingegangen am 1. Mai 1943)

Nachdem Verf. (1943) in der vorigen Abhandlung über die Säure- und Säure-Cystein-Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes berichtet hatte, taucht hier die Frage nach deren Verhältnis zur Aktivierung durch Enterokinase auf. Die Entdeckung der Enterokinase im Darmsaft verdankt man den Untersuchungen von Schepowalnikow (1899), denen eine grosse Anzahl von Studien über die Kinaseaktivierung in der Literatur folgte. Dennoch scheint die Frage nach dem Wesen der Aktivierung bis heute noch nicht endgültig geklärt zu sein.

Die Darmsaft-Aktivierung trat nach den Angaben Schepowalnikows sowohl in alkalischer als besser noch in neutraler und schwach saurer Lösung zutage. Er hatte schon seinerzeit auf eine enzymatische Trypsinbildung aus einem Zymogen hingewiesen.

Zu dieser Fermenttheorie, die durch die Versuche von Bayliss und Starling (1904, 1905) gestützt wurde, bekamen sich Meyer (1909/10) und dann Mellanby und Woolley (1912-13), welche die Enterokinase als ein Enzym mit einem Optimum der Wirkung bei neutraler Reaktion aufgefasst haben. Im Gegensatz zu dieser

Ansicht vertraten Waldschmidt-Leitz und Mitarbeiter (1924 u. 1927) die Anschauung, dass es sich hier um eine stöchiometrische Verbindung zwischen der Kinase und dem Trypsinogen handelt.

Nach den neuen Angaben von Northrop (1939) wurde das noch nicht ganz reine krystallinische Chymotrypsinogen durch Enterokinase (Dünndarmmucosa) bei P_H 7–8 aktiviert, aber das wiederholt umkrystallisierte nicht.

Das krystallinische Trypsinogen wurde durch Enterokinase am günstigsten bei P_H 6–9 aktiviert. Über die Wirkungsweise der Kinasewirkung äussert sich Northrop dahin, dass die Geschwindigkeitskonstante der Kinasewirkung parallel mit der Kinasekonzentration verläuft und dass die Kinasewirkung eine monomolekulare Reaktion darstellt. Er war geneigt, unter dieser enzymatischen Reaktion der Kinaseaktivierung eine Aufspaltung der Peptidkette bei der Überführung des Trypsinogens in Trypsin anzunehmen, wobei er auch auf die Penicillium-Kinase (Kunitz, 1938) hinwies, die am stärksten bei P_H 3 wirkt und die sich selbst als proteolytisch stark aktiv erwies.

In Fortführung des diesbezüglichen Studiums mit dem Sekretsaft des Hundes¹⁾ hat Verf. unter Leitung von Prof. Dr. Utzino die aktivierende Erscheinung der Enterokinase vergleichend untersucht. Die Resultate sind zusammengefasst wie folgt.

Hier muss Verf. zuerst ein Verfahren, das sich auf die Gewinnung des ereptase- wie katheptasefreien Enterokinase-Präparates bezieht und schon in der vorangegangenen Arbeit benutzt wurde, eingehend beschreiben. Um ein Präparat einer katheptase- wie erepsinfreien (auch Kaseinasefreien) Enterokinase zu gewinnen, bearbeitete man hier mit Mucosabrei des Schweinedünndarmes in der Weise, dass man ihn nach eintägiger Aufbewahrung in Alkohol mit Aceton und Äther trocknete. Dieses Mucosapulver erwiesen sich gegen Kasein bei P_H 7,5 und bei P_H 5,5 und auch gegen Pepton und Diglycin bei P_H 7,5 als proteolytisch

1) Herren Prof. Dr. Satake und ausserord. Prof. D. Wada im physiologischen Institut hiesiger Universität ist Verf. für die Anlegung der Pankreasfistel zu herzlichem Dank verpflichtet.

inaktiv. Da schon seit früher die ereptische und auch tryptische Wirkung der Mucosamazeration des Dünndarmes anerkannt worden sind, muss man sich von der Inaktivität des Kinasepulvers gegenüber Kasein und Peptiden überzeugen, wenn das Kinasepräparat auch in einer ziemlich grossen Menge von 0,1 g verwendet wurde.

Wie Tabelle I zeigt, blieb das Präparat ohne Einfluss auf Kasein, Pepton und Diglycin (Tabelle I). Was die genügende Menge des Kinasepräparats anbelangt, so reichte 0,02–0,05 g Pulver aus, 1 ccm unaktiven Pankreassaft zu vollaktivieren (Tabelle II).

Die günstige Reaktion bei der Kinaseaktivierung des unaktiven Saftes erwies sich bei P_H 5–8 (bei $37^\circ C$ und 30 Min.), da der in diesem P_H -Bereich behandelte Pankreassaft die stärkste Kaseinhydrolyse zeigte (Tabelle III). Hier sei besonders erwähnt, dass die Kinasewirkung sich also auch bei schwach alkalischer Reaktion von P_H 7–8 und zwar bei $37^\circ C$ 30 Min. vollziehen kann, während die Säure- oder Säure-Cystein-Aktivierung in der Hauptsache bei saurer Reaktion zu Tage trat. Daher möchte Verf. zum Zweck der Kinase-Aktivierung 0,05 g Kinasepulver für 1 ccm Saft unter Zusatz von 9 ccm Wasser (10fache Verdünnung) bei P_H 8 und $37^\circ C$ 30 Min. lang als Behandlung vorschlagen.

In Hinsicht der Resistenzfrage blieb eine Säure- und Alkaliwirkung (P_H 2–9,5, bei $37^\circ C$ 1–2 Stunden lang) fast ohne schädigenden Einfluss auf Kinasepulver. (Tabelle IV).

Durch Erhitzen bei $60^\circ C$ (30 Min.) büsste der Saft fast nichts ein, über $70^\circ C$ (30 Min.) wurde er aber deutlich beeinträchtigt (Tabelle V).

Der Aktivator schien viel mehr in Lösung bei Erhitzung z. B. bei $70^\circ C$ einzugehen, da der unlösliche Bodensatz seine Wirkung durch Erhitzung bei dieser Temperatur grösstenteils verlor. Darauf hin kam die Löslichkeit des aktivierenden Faktors in Frage. Nach Extraktion mit Wasser bei $37^\circ C$ (30 Min.) ging der grösste Teil des Faktors in Lösung über, der Rückstand erwies sich aber auch als stark aktiv (Tabelle VI). Mit Äthylalkohol oder Amylalkohol war der Aktivator schwer extrahierbar, er blieb jedoch im Rückstand.

Hier seien die Versuche betreffs der Resistenz des aktivierten Pankreassaftes angeführt. Die tryptische Wirkung des mit Kinase aktivierten Pankreassaftes wurde schon durch Hitze bei 60°C (30 Min.) beeinträchtigt, bei 50°C blieb sie jedoch noch erhalten (Tabelle VII). Tabelle V zeigt die Beständigkeit des Kinasepulvers gegenüber Erhitzung bei 60°C (30 Min.).

Die Säurewirkung bei P_H 4,5–5,0 (37°C 30 Min.) blieb fast ohne Einfluss auf die Kinase-Saft-Aktivität (Tabelle VIII). Auf die Säureinaktivierung des frischen nicht aktivierten Pankreassaftes möchte Verf. später zurückkommen.

Nun wollen wir uns mit der vergleichenden Beobachtung über die Säure-Aktivierung und Kinase-Aktivierung beschäftigen. Hier sei besonders hervorgehoben, dass der Pankreassaft, der mit einer kleinen Menge aktivem Pankreassaft bei 37°C 30 Min. lang aufbewahrt wurde, eine starke tryptische Wirkung entfalten konnte. Diese Aktivität stand aber niedriger als diejenige des mit Kinase aktivierten Saftes. Die Menge aktiven Saftes selbst, die eine deutliche aktivierende Wirkung zeigte, genügte nicht Kasein anzugreifen und blieb auch ohne Einfluss auf die Aktivierung, falls der Saft einmal erhitzt wurde (Tabelle IX). Nach der Angabe Northrops (1939) wurde Chymotrypsinogen durch Trypsinwirkung und Trypsinogen selbst auch autokatalytisch durch dieselbe aktiviert. Diese Tatsache konnte Verf. also hier auch in inaktivem Sekreassaft der Pankreasdrüse bestätigen. Diese Ergebnisse lassen daran denken, dass das Wesen der aktivierenden Wirkung des aktiven Pankreassaftes etwas mit irgendeiner Proteolyse durch Pankreassaft zu tun haben müsse, und zwar kann eine Entfernung des Inhibitors im Sinne Northrops durch Proteolyse in Betracht kommen.

Um nun eine Aktivitätsfrage zu beantworten, verglich man den Spaltungsgrad des Kaseins und des Peptons durch den Pankreassaft, der einmal mit Cystein bei P_H 5,5 und 37°C (24 Std.) und ein andermal mit Kinase bei P_H 8,0 bei 37°C (30 Min.) aktiviert wurde. Die Resultate ergaben fast keinen Unterschied zwischen den Hydrolysengraden in diesen beiden Aktivierungsmoden, falls Kasein oder Pepton als Substrat benutzt wurden

(Tabelle X).

Durch Zusatz von CuSO_4 oder $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ trat die Säureaktivierung nicht zu Tage; die Säure-Cystein-Aktivierung wurde dadurch deutlich, und auch die Kinase-Aktivierung nur in schwächerem Masse gehemmt. MnSO_4 und CoSO_4 wirkten auch deutlich in hemmendem Sinne auf die Säure-Aktivierung; vor allem widerstand die Kinase-Aktivierung diesen Metallsalzen gegenüber. Dagegen scheint NiSO_4 fast ohne Einfluss zu bleiben (Tabelle XI). Nach diesen Ergebnissen sei hier betont, dass durch Cu- oder Fe-Ion die Säure-Aktivierung vollständig und auch die Kinase-Aktivierung, wenn auch in schwächerem Grade, beeinträchtigt wurde, während Ni-Ion fast keinen Einfluss ausübte. Da man aus obigen Resultaten etwas Verschiedenes zwischen den beiden Säure- und Kinase-Aktivierungen des Pankreassaftes annehmen muss, untersuchte man hier das Verhalten des Pankreassaftes gegenüber Säure- und Alkali-Behandlung unter besonderer Berücksichtigung ihrer Aktivierbarkeit.

Merkwürdigerweise ging die Säure-Cystein-Aktivierbarkeit des inaktiven Saftes durch Aufbewahrung desselben mit Salzsäure bei pH 3–4 (37°C 1 Std.) verloren, während der Saft durch Zusatz von Enterokinase seine tryptische Wirkung entfalten konnte, und zwar nach 24stündiger Einwirkung, obwohl der Aktivitätsgrad deutlich niedriger als derjenige des nicht behandelten Saftes stand (Tabelle XII–A). Die Aktivität nahm mit Dauer der Säure-Wirkung ab. Im gleichen Sinne resultierte auch die Natronlauge-Behandlung des Saftes (bei pH 12 1 Std.), indem die darauf erfolgte Säure-Cystein-Behandlung keine aktivierende Wirkung auf den Saft ausübte; die Kinase-Aktivierung blieb jedoch noch erhalten und ging erst nach 24stündiger Alkali-Wirkung verloren. Hier sei noch erwähnt, dass bei der Aufbewahrung des Saftes bei pH 10 (24 Std.) die Aktivierbarkeit in beiden Fällen, fast unverändert erhalten bleiben konnte. Diese Beständigkeit des Saftes erstreckt sich vielleicht in einem Bereich von pH 5,5–10, wie es schon aus den vorigen Ergebnissen ersichtlich ist. Auf Grund dieser Ergebnisse muss die Einstellung der Säure-Cystein-Aktivierung anders als diejenige der Kinaseaktivierung sein, insofern hier eine

enzymologische Wirkung als Aktivator in Frage kommt.

Nach Aufbewahrung dieses partiell denaturierten Pankreassaftes bei $\text{pH } 8$ 24 Stdn. lang im Eisschrank, schien die Aktivität des aktivierten Saftes in beiden Fällen etwas stärker zu werden (Tabelle XII-B). Dies kann man vielleicht entweder aus der Wiederherstellung der Aktivierbarkeit oder aus der Aktivitätserhöhung durch Aufbewahrung im Eisschrank erklären. Ein Beispiel einer Wiederherstellung der durch Hitze inaktivierten Proteinase hat schon Northrop (1939) beschrieben.

Um ferner noch den Unterschied dieser beiden Aktivierungsmodi festzustellen, nahm Verf. hier das Adsorptionsverhalten des Saftes in Angriff. Bei der Kieselguradsorption bei $\text{pH } 4$ wurde nur die Kinase-Aktivierbarkeit in einem Eluat bestätigt, nicht aber die Säure-Cystein-Aktivierbarkeit, wie dies bei Säurewirkung bei $\text{pH } 4$ der Fall war (Tabelle XIII).

Das Ergebnis lehrt uns also, dass in guter Übereinstimmung mit dem vorigen Resultate man eine durch Kinase, nicht aber durch Säure-Cystein, aktivierbare Fraktion aus dem Pankreassaft durch Adsorption zu trennen imstande ist. Da in der Adsorptionsrestlösung eine Selbstaktivierung bei längerer Digestion beobachtet wurde, konnte man hier nichts Bestimmtes aussagen, obwohl die Aciditätszunahme in Versuchen mit Säure-Cystein aktiviertem oder nicht aktiviertem Pankreassaft fast gleichwertig, im demjenigen mit Kinase aktiviertem aber deutlich grösser als solche war.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichende Untersuchungen über die Kinase- und Säure-Cystein-Aktivierung des Pankreassaftes vorgenommen. Zuerst wurde eine Methode der Darstellung der Enterokinase, wobei diese aus Dünndarmmucosa bereitet wurde und sich als katheptisch (Kaseinspaltung bei $\text{pH } 5,5$) wie ereptisch inaktiv erwies, dargelegt. Der pH -Bereich der Aktivierung durch diese Kinasepräparate liegt bei $\text{pH } 5-8$ ($0,05 \text{ g}$ Kinase für 1 ccm Pankreassaft, 37°C 30 Min.). Säure- und Alkaliwirkung (37°C 1-2 Std.) blieben fast ohne Schädigung auf Kinasewirkung, die durch Hitze bei 70°C (30 Min.) deutlich ein-

büsste. Der aktivierende Faktor ging grösstenteils in wässrige Lösung bei 37°C (30 Min.) nicht aber in Alkohol.

2. Hier sei hervorgehoben, dass die tryptische Wirkung des Sekreassaftes durch eine kleine Menge aktiven Saftes, der durch Enterokinase aktiviert wurde und in solcher Dosis nicht mehr tryptische Aktivität entfaltete, deutlich aktiviert werden konnte. Die Tatsache spricht zugunsten der Ansicht Northrops (1939) im Sinne der autokatalytischen Aktivierung.

3. In bezug auf Aktivitätsgrade des Pankreassaftes, der durch Säure-Cystein oder durch Kinase aktiviert wurde, konnte man fast keinen Unterschied feststellen, insofern es Kasein- oder Peptonhydrolyse unter den angegebenen Bedingungen betrifft. Die Säure-Aktivierung wurde durch Zusammenbringen mit CuSO_4 oder $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ fast vollständig aufgehoben, die Säure-Cystein-Aktivierung auch deutlich aber partiell, die Kinase-Aktivierung jedoch nur in schwächerem Masse gehemmt. Dieser Reihe nach wirkten MnSO_4 und CoSO_4 hemmend auf die Aktivierung des Saftes, während NiSO_4 ohne Einfluss blieb.

4. Nach Aufbewahrung des unaktiven Saftes bei pH 3–4 (37°C 1 Std.) oder bei pH 12 (37°C 1 Std.) verschwand die Aktivierbarkeit des Saftes durch Säure-Cystein, diejenige durch Kinase jedoch, obwohl etwas abgeschwächt, blieb noch erhalten. Behandlung bei pH 5,5–10 schien keinen Einfluss auszuüben.

5. Aus dem Kieselguradsorbat des Pankreassaftes wurde ein Eluat in alkalischer Lösung gewonnen, welches noch Kinase-Aktivierbarkeit zeigen konnte, nicht aber Säure-Cystein-Aktivierbarkeit. Auf Grund dieser obigen Beobachtungen möchte Verf. unter Kinaseaktivierung etwas anderes als Säure- oder Säure-Cystein-Aktivierung verstehen oder eine Nicht-Einheitlichkeit der Zymogenelemente im Pankreassaft hinsichtlich der Aktivierbarkeit annehmen.

Dem Unterrichtsministerium sei an dieser Stelle bestens gedankt für die Gewährung einer Unterstützung zur Anregung wissenschaftlicher Forschung.

Prof. Dr. S. Utzino.

LITERATUR.

- Bayliss, W. M. u. Starling, E. H. (1904/1905): Journ. Physiol., **30**, 61; **32**, 129.
- Kunitz, M. (1938): Journ. gen. Physiol., **21**, 601.
- Kawaharada, M. (1943): Dieses Journ., **36**, 457.
- Meyer, K. (1909-10): Biochem. Zeits., **23**, 68.
- Mellanby, J. u. Woolley, V. J. (1912-13): Journ. Physiol., **45**, 370.
- Northrop, J. H. (1939): Crystalline Enzymes, New York.
- Schepowalnikow, N. P. (1899): Malys Jahresber., **29**, 378.
- Waldschmidt-Leitz, E. (1924): Zeits. physiol. Chem., **132**, 181.
- Waldschmidt-Leitz, E. u. Linderström-Lang, K. (1927): ibidem, **166**, 227 u. 241.

Versuchsteil.

TABELLE I.

*Das proteasenfrie Kinasepulver aus der Dünndarmmucosa
des Schweines.*

Kinasepulver: Zur Bereitung des proteasenfrien Enterokinasepulvers kratzte man Mucosa des Schweinedünndarms aus, der ungefähr einen Meter lang von dem Pylorusteil abgeschnitten und mit Wasser gut gewaschen worden war, und zerrieb sie in einem Porzellanmörser gut mit der ca. 4fachen Volummenge von 95%igem Alkohol. Nach 24stündigem Stehenlassen in Alkohol saugte man den Alkohol durch Filter ab, verrührte den Rückstand gut mit der dreifachen Volummenge Aceton, und saugte dann das Aceton ab. Nach 3maliger Entwässerung durch Aceton behandelte man zuletzt den Rückstand mit Äther, filtrierte den Äther ab und trocknete den Rückstand im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure. Das getrocknete Präparat pulverisierte man im Mörser und siebte es durch ein feines Sieb.

Versuchsansatz: 20 ccm 1%ige Substrat- oder 0,05 Mol-Diglycinlösung wurden mit 0,05 oder 0,1 g Kinasepulver unter Zusatz von Phosphat-Puffer auf 25 ccm gebracht und unter Toluol bei pH 7,5 und $37^{\circ}C$ digeriert. Zur Kontrolle wurde Kinasepulver-Puffer ohne Kasein unter den gleichen Bedingungen digeriert.

Die Acidität in 5 ccm Digestat ermittelte man nach Sørensen mit 0,1 n -NaOH.

Die Kontrollwerte wurden von denjenigen des Hauptversuchs abgezogen und die korrigierten Werte des Hauptversuchs in die Tabelle aufgenommen.

Um die Freiheit der katheptischen wie ereptischen Aktivität des Kinasepulvers festzustellen, liess man den Ansatz mit Kasein bei pH 5,5, 6,0, 7,0 und 8,0 digerieren. Die Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat nach 72 Stunden ist wie folgt: 0, 0,03, 0,04 und 0,08 ccm 0,1 n -NaOH respektive.

Substrate	Aciditätszunahme in 5 ccm Digestat bei P _H 7,5 (ccm 0,1 n-NaOH)		
	Zeit (Stdh.)	Kinasemenge (g)	
		0,05	0,1
Kasein (Hammarsten)	5	0,01	0
	24	0,02	0,03
	72	0,04	0,09
Witte-Pepton	5		0
	24	—	0,02
	72		0,15
Pepton K	5		0
	24	—	0,01
	72		0,06
Pepton S	5		0
	24	—	0,02
	72		0,03
Glycylglycin	5	0	0,01
	24	0,01	0,01
	72	0,01	0,03

TABELLE II.

Einfluss der Menge des Kinasepulvers auf die Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes (Hund).

Pankreassaft: Zur Aktivierung wurde 1 ccm Pankreassaft, der aus der Pankreasfistel des Hundes nach einer Mahlzeit mit Reis-Fleisch und Milch gewonnen worden war, mit einer gewissen Menge Kinasepulver (s. Tabelle I) in 9 ccm Wasser bei 37°C 30 Min. lang stehen gelassen und dann filtriert oder abzentrifugiert. Je 3 ccm dieser aufs 10fache verdünnten Pankreassaftlösung kamen zur Verwendung. Zur Kontrolle wurde 1 ccm Pankreassaft mit 9 ccm Wasser ohne Kinase behandelt und auf seine Inaktivität geprüft.

Versuchsansatz: 20 ccm 1%ige Kaseinlösung + 3 ccm Pankreassaftlösung (mit Kinase behandelt) + 2 ccm Phosphatpuffer; digeriert bei P_H 8,0 und 37°C.

Allgemeine Kontrolle mit Pankreassaftlösung und Puffer ohne Kasein. Formoltitration in 5 ccm Digestat. Die korrigierten Werte sind in der Tabelle angegeben.

Substrat	Aciditätszunahme in 5,0 ccm Digestat bei PH 8 (ccm 0,1 n-NaOH)									
	Zeit (Stdn.)	Ohne Kinase	Kinasemenge (g)							
			0,001	0,002	0,005	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2
Kasein	5	0,03	0,05	0,1	0,17	0,21	0,51	0,58	0,59	0,61
(Hammarsten)	24	0,06	0,15	0,18	0,37	0,51	0,71	0,76	0,76	0,75
PH 8,0	72	0,3	0,43	0,59	0,65	0,81	0,87	0,89	0,92	0,9

TABELLE III.

Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes durch das Kinasepulver bei verschiedenen PH-Werten.

Bei PH 4–8 wurde 1 ccm Pankreassaft, der mit 0,05 g Kinasepulver (s. Tabelle I) unter Einstellung bei einem bestimmten PH-Wert mittels 0,1 n-HCl oder 0,1 n-NaOH mit Wasser auf 10 ccm gebracht worden war, bei 37°C 30 Min. lang stehen gelassen und dann nach dem Erkalten bei Zimmertemperatur bei PH 8 eingestellt.

Versuchsansatz: 20 ccm 1%ige Kaseinlösung + 3 ccm Pankreassaftlösung (=10fache Verdünnung) + 2 ccm Puffer; digeriert bei PH 8,0 und 37°C.

Eine Kontrolle mit Saft-Kasein ohne Kinasepulver und eine andere mit Saft-Kinase ohne Kasein. Die Werte der Aciditätszunahme bei der letztgenannten Kontrolle wurden von denen des Hauptversuchs abgezogen und diese korrigierten Werte in die Tabelle eingetragen.

Zeit (Std.n.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei P _H 8 (ccm 0,1 n-NaOH)					
	Kontrolle		Aktivierungs-P _H			
	Ohne Kinasepulver		P _H 4	P _H 5	P _H 6	P _H 7
5	0,01		0,02	0,7	0,74	0,77
24	0,1		0,48	0,92	0,93	0,95
72	0,21		0,76	0,99	1,0	1,03

TABELLE IV.

Säure- und Alkali-Beständigkeit des Kinasepulvers.

Je 0,05 g Kinasepulver suspendierte man in 9 ccm Flüssigkeit unter Einstellung mit verdünnter HCl- oder NaOH-Lösung und Wasser auf einen gewissen P_H-Wert und liess die Suspension bei 37°C 1–2 Std. lang stehen, worauf diese Lösung (9 ccm) nach der Neutralisation zur Aktivierung von 1 ccm Pankreassaft (37°C 30 Min. lang) benutzt wurde. In den Versuchen wurden alsdann 3 ccm dieser Saftlösung (=10fache Verdünnung) verwendet.

Versuchsansatz: Ebenso wie in der Tabelle III.

Zeit (Std.n.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei P _H 8 (ccm 0,1 n-NaOH)							
	Kontrolle		Aktivierung mit Säure oder Alkali behandelter Kinasesuspension					
	Ohne Kinasepulver	Mit 0,05 g nicht behand. Kinasepulver	P _H -Werte und ihre Wirkungskdauer(Std.) bei 37°C					
			P _H 2		P _H 4	P _H 8,5	P _H 9,5	
			1st	2st	1st	1st	1st	2st
5	0	0,65	0,75	0,73	0,75	0,77	0,74	0,65
24	0,01	0,9	0,87	0,97	0,9	0,89	0,83	0,84
72	0,18	1,03	1,01	1,06	1,01	1,02	0,96	0,99

TABELLE V.

Thermostabilität des Kinasepulvers.

Je 0,05 g Kinasepulver, in 9 ccm Wasser (PH 6,2) suspendiert, wurde im Wasserbade bei einer gewissen Temperatur während 30 Minuten erhitzt und dann auf seine Wirkung hin geprüft. Andererseits liess man diese Suspension nach der Einstellung bei PH 8 weiter bei 37°C 48 Stunden lang stehen, um sie dann in den Versuchen zu verwenden. Die Suspension trennte man durch Zentrifugieren in Lösung und Bodensatz und prüfte danach 9 ccm Flüssigkeit und den entsprechenden Bodensatz, der wieder in 9 ccm Wasser suspendiert wurde, auf ihre aktivierende Wirkung auf 1 ccm Pankreassaft hin. 3 ccm dieser Saftlösung wurden bei den Versuchen benutzt.

Versuchsansatz: Ebenso wie in Tabelle III.

Arten der Aktivierung	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei PH 8 (ccm 0,1 n-NaOH)						
	Zeit (Std.)	Kontrolle	Aktivierung durch erhitzte Kinasepulver (PH 6,2)				
		Ohne Kinase	Temperatur (C) (30 Min.)				
			60°	70°	80°	90°	100°
Extrakt	5	0	0,66	0,07	0,06	0,05	0
	24	0,06	0,84	0,45	0,43	0,38	0,21
	72	1,19	0,93	0,85	0,83	0,76	0,61
Rückstand	5	—	0,62	0,02	0	0	0
	24	—	0,82	0,09	0,07	0,07	0,05
	72	—	0,93	0,28	0,21	0,19	0,18
			Die erhitzte Suspension wurde unter Umeinstellung bei PH 8 mit NaOH weiter 48 Stunden lang bei 37°C aufbewahrt.				
Extrakt	5	0	0,65	0,06	0,01	0	0
	24	0,06	0,83	0,47	0,43	0,26	0,18
	72	0,21	0,95	0,86	0,83	0,7	0,58
Rückstand	5	—	0,63	0,02	0,01	0	0
	24	—	0,85	0,1	0,08	0,07	0,05
	72	—	0,93	0,3	0,26	0,24	0,23

TABELLE VI.

Kinasewirkung des Wasser-, Alkohol- oder Amylalkoholextraktes des Kinasepulvers (Mucosapulver des Schweines).

0,1 g Kinasepulver liess man in 18 ccm Wasser bei 37°C 30 Minuten lang unter zeitweisem Schütteln stehen und dann abzentrifugieren. Diese obere Flüssigkeit kam als Extrakt und auch der Rückstand als Suspension in 18 ccm Wasser nach einmaligem Auswaschen mit kaltem Wasser zur Anwendung. Für die Aktivierung liess man 1 ccm Pankreassaft mit 9 ccm Extrakt oder 9 ccm Suspension des entsprechenden unlöslichen Kinasepulvers bei 37°C 30 Min. lang stehen.

Bei Alkoholextraktion wurden je 0,3 g Kinasepulver in 100 ccm 80%igem Äthylalkohol oder in 100 ccm Amylalkohol bei 60°C 24 Sdt. lang extrahiert und dann abfiltriert. Nachdem man den Alkoholextrakt unter vermindertem Druck bei 40°C abgedampft hatte, nahm man den Rückstand in 30 ccm Wasser auf. Der unlösliche Extraktionsrückstand wurde von dem anhaftenden Extraktionsmittel im Vakuumexsikkator befreit und in 30 ccm Wasser suspendiert. Für die Aktivierung wurde 1 ccm Pankreassaft mit 5 ccm dieser wässerigen Lösung des abgedampften Extraktes oder 5 ccm Suspension des unlöslichen Rückstandes und 4 ccm Wasser bei 37°C 30 Minuten lang aufbewahrt, je 3 ccm dieser so behandelten Saftlösung wurden dann bei den Versuchen bennutzt.

Kontrolle entweder ohne Kinasepulver oder mit Kinasepulver (1 ccm Saft + 0,05 g Kinasepulver in 9 ccm H₂O, 37°C 30 Min.).

Versuchsansatz: Ebenso wie in Tabelle III.

Extraktion	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei P _H 8 (ccm 0,1 n-NaOH)				
	Zeit (Std.)	Kontrolle mit Kinasepulver		Aktivierung des Pankreassaftes	
		Ohne Kinase- pulver	Mit 0,05 g Kinase- pulver	Mit Extrakt	Mit Rückstand
Wasser- extraktion	5	0,03	—	0,75	0,75
	24	0,08	—	0,89	0,78
	72	0,29	—	0,98	1,05
Äthylalkohol- extraktion	5	0	0,63	0,01	0
	24	0,06	0,81	0,09	0,15
	72	0,21	0,98	0,23	0,49
Amylalkohol- extraktion	5	0,01	0,64	0,02	0,71
	24	0,07	0,84	0,1	0,93
	72	0,25	1,02	0,29	0,99

TABELLE VII.

*Thermolabilität der tryptischen Wirkung des mit
Enterokinase aktivierten Pankreassaftes.*

Nachdem je 1 ccm Pankreassaft mit 0,05 g Enterokinase in 9 ccm Wasser bei P_H 8 und 37°C 30 Minuten lang aktiviert worden war, erhitzte man den aktiven Saft in einem Probierglas im Wasserbade bei 50°–80°C eine halbe Stunde lang und prüfte ihn auf seine tryptische Wirkung im angegebenen Versuchsansatz hin, wie in Tabelle III angegeben ist.

Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei P_H 8 (ccm 0,1 n-NaOH)

Zeit (Std.)	Bad-Temperatur (C)					
	Nicht erhitzt	50°	60°	65°	70°	80°
5	0,83	0,74	0,27	0,14	0	0
24	1,04	0,94	0,5	0,38	0	0
72	1,12	1,02	0,65	0,54	0	0

TABELLE VIII.

*Einfluss des Säuremediums auf den mit Enterokinase
aktivierten Pankreassaft.*

Die mit Kinasepulver wie in der Tabelle VII aktivierte Pankreassaftlösung (10fach verdünnt) liess man weiter nach Einstellung bei P_H 4,5 und 5 mittels 0,1 n -HCl bei $37^\circ C$ 30 Minuten lang stehen, um die Säurewirkung zu prüfen.

Versuchsansatz: Ebenso wie in Tabelle III.

Zeit (Stdn.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei P_H 8 (ccm 0,1 n -NaOH)			
	Kontrolle nicht mit HCl behandelt		P_H -Werte bei HCl-Wirkung ($37^\circ C$, 30 Min.)	
	Ohne Kinasepulver	Mit Kinase	P_H 4,5	P_H 5
5	0	0,86	0,78	0,87
24	0,11	1,03	0,95	1,01
72	0,26	1,07	1,02	1,09

TABELLE IX.

Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes durch eine kleine Menge des aktivierten Pankreassaftes des Hundes.

Um einen aktiven Pankreassaft zu gewinnen, behandelte man 1 cm frischen unaktiven Pankreassaft mit 0,05 g Enterokinase (proteinasefrei) in 9 cm Wasser bei pH 8 und 37°C 30 Minuten lang. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, erwies dieser Pankreassaft sich dann als aktiv.

1 cem frischer inaktiver Pankreassaft wurde mit 0,001–0,005 cem jenes aktivierten Pankreassaftes (entsprechend 0,01–0,05 cem Saft, meistens nicht erhitzt, in einigen Fällen aber bei 100°C 30 Minuten lang erhitzt, um die Wirkung auszuschliessen) in 9 cem Wasser versetzt und bei 37°C 30 Minuten lang aufbewahrt. Je 3 cem der behandelten Saftlösung kamen jedesmal zur Verwendung. Um die geringe Trypsinwirkung der zugesetzten Saftmenge anzuzeigen, führte man die Kontrollversuche mit nur 0,0005–0,001 cem aktiviertem Saft ohne frischen Saft aus.

Zur Kontrolle wurden auch 3 cem nichtbehandelte Saftlösung (1·10) benutzt. Versuchssatz: 20 cem 10% 17

Versuchsansatz: 20 cem 1%ige Kaseinpufferlösung + 3 cem Saftlösung oder eine kleine Menge aktiver Pankreassaft; mit Puffer auf 25 cem gebracht und bei PH 8,0 unter Toluol digeriert.

[illegible]

Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei PH 8 (cem 0,1 n-NaOH)											
Zeit (Stdn.)	Kontrolle		Kontrolle mit der Zusatzmenge des aktiven Pankreassaftes allein.					Zusatzmenge des aktivierten Pankreassaftes für 1 cem unaktiven Saft.			
	Ohne Kinasepulver	Mit Kinasepulver 0,05 g	0,3 cem	0,005 cem	0,0025 cem	0,001 cem	0,005 cem		0,0025 cem		
							Nicht erhitzt	Erhitzt	Nicht erhitzt	Erhitzt	
5	0	0	0,81	0,02	0	0	0,29	0	0,19	0	0,05
24	0,09	0,07	1,0	0,1	0,05	0,02	0,69	0,07	0,55	0,07	0,35
72	0,23	0,22	1,1	0,28	0,13	0,06	0,84	0,25	0,77	0,24	0,6

TABELLE X.

*Kasein- und Pepton-K-Spaltung durch den mit Säure-Cystein
oder Enterokinase aktivierten Pankreassaft des
Hundes bei verschiedenen PH-Werten.*

Die Säure-Cystein-Aktivierung geschah in der schon beschriebenen Weise (I. Mitteilung Kawaharada, 1943), indem man 8 ccm Pankreassaft mit 8 ccm 0,1 Mol-Cysteinlösung nach dem Einstellen bei PH 5.5 mittels 10%iger Salzsäure bei 37°C 24 Stdn. lang aufbewahrte.

Für die Enterokinase-Behandlung wurden 8 ccm Pankreassaft mit 0,4g Kinasepulver in 8ccm Wasser bei 37°C 30 Min. lang stehen gelassen. Der PH-Wert der Saft-Kinaselösung lag bei PH 8,0.

Versuchsansatz: Nach der Behandlung wurden 2 ccm Pankreassaftlösung (doppelte Verdünnung) mit 20 ccm 1%iger Kasein (Hammarsten)-oder 2%iger Pepton K-Citratpufferlösung und 3 ccm Citratpuffer bei verschiedenen PH-Werten unter Toluol bei 37°C digeriert. Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne Substrat.

Die Angaben in der Tabelle erfolgten nach Abzug dieses Kontrollwertes.

Substrate	Aktivierung	Zeit (Stdn.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)						
			PH-Werte bei der Digestion						
			PH 4	PH 4,5	PH 5	PH 5,5	PH 6	PH 7	PH 8
Kasein (0,8%) (Hammarsten)	Mit Säure-Cystein PH 5,5 37°C 24 Stdn.	24	0	0,17	0,39	0,53	0,62	0,86	1,04
		72	0,12	0,47	0,65	0,75	0,76	1,0	1,15
		120	0,13	0,6	0,75	0,83	0,79	1,05	1,22
	Mit Kinasepulver PH 8,0 37°C 30 Min.	24	0,21	0,44	0,58	0,51	0,5	1,03	1,09
		72	0,4	0,61	0,68	0,62	0,61	1,21	1,22
		120	0,4	0,65	0,71	0,71	0,66	1,22	1,22
	Mit Säure-Cystein PH 5,5 37°C 24 Stdn.	24	0,04	0,16	0,28	0,34	0,42	0,59	0,68
		72	0,13	0,25	0,38	0,55	0,55	0,91	0,93
		120	0,13	0,35	0,45	0,64	0,65	1,01	1,05
Pepton · K (1,8%)	Mit Kinasepulver PH 8,0 37°C 30 Min.	24	0,06	0,21	0,37	0,42	0,55	0,57	0,73
		72	0,15	0,35	0,47	0,6	0,83	0,96	0,96
		120	0,24	0,37	0,48	0,74	0,93	1,07	1,07

TABELLE XI.

*Einfluss der Metallsalze auf die Säure-, Säure-Cystein- und
Kinase-Aktivierung der tryptischen Wirkung
des Pankreassaftes.*

In den Versuchen wurden 3 cem Pankreassaft mit Metallsalz und Wasser auf 30 cem gebracht, um schliesslich die Salzkonzentration in 0,01 Mol und den P_{H} -Wert bei P_{H} 5,5 zu behalten und die Lösung bei 37°C 24 Stunden lang stehen zu lassen. Diese so behandelte Saft-Metallsalz-Lösung (10 cem) liess man einerseits mit 0,05 g Kinasepulver bei P_{H} 8 und bei 37°C 30 Minuten lang oder andererseits weiter mit 0,032 g Cystein (0,02 Mol) bei P_{H} 5,5 und bei 37°C 24 Stunden lang stehen.

Für den nicht mit Metallsalz vorbehandelten Pankreassaft besteht der Ansatz entweder aus 1 cem Saft und 0,05 g Kinase in 9 cem Wasser oder aus 1 cem Saft und 0,016 g Cystein in 9 cem Wasser. Die anderen Bedingungen waren ebenso wie bei dem behandelten Saft.

Versuchsansatz: Ebenso wie in Tabelle III.

Aktivierung	Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei P_{H} 8 (cem 0,1 <i>n</i> -NaOH)						
	Zeit (Stdn.)	Kontrolle (Nicht mit Salz behandelt)	Metallsalze (P_{H} 5,5 37°C, 24 Stdn.)				
			CuSO ₄	Fe ₂ (SO ₄) ₃	MnSO ₄	CoSO ₄	NiSO ₄
Ohne Aktivierung	5	0	0	0	0,1	0,08	0,74
	24	0,05	0,05	0,03	0,24	0,39	0,91
	72	0,13	0,07	0,06	0,34	0,68	1,05
Mit Kinasepulver (P_{H} 8, 37°C, 30 Min.)	5	0,86	0,55	0,48	0,5	0,7	0,74
	24	1,06	0,71	0,63	0,6	0,89	0,91
	72	1,14	0,89	0,73	0,7	0,99	1,1
Mit Cystein (P_{H} 5,5, 37°C, 24 Stdn.)	5	0,7	0,32	0,33	0,54	0,55	0,69
	24	0,95	0,42	0,48	0,66	0,68	0,89
	72	1,15	0,49	0,61	0,83	0,83	1,0

TABELLE XII-A.

Säure-Cystein- und Enterokinase-Aktivierbarkeit der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes nach der Säure- od. Alkali-Behandlung des unaktiven Saftes.

Die Vorbehandlung des unaktiven Pankreassaftes mit Säure oder Alkali erfolgte in der folgenden Weise. 30 ccm unaktiven Pankreassaft brachte man unter Einstellung bei P_H 3, 4, 10 und 12 mittels 10%iger Salzsäure oder Natronlauge mit Wasser auf 60 ccm (2fache Verdünnung) und liess das Gemisch bei $37^\circ C$ 1, 2, 5 oder 24 Stunden lang stehen. Nach der Aufbewahrung wurde die eine Hälfte der Saftlösung nach der Kinase- oder Säure-Cystein-Aktivierung zum Versuche herangezogen (Tabelle XII-A), während die andere Hälfte nach Umstellung auf P_H 8 mittels 0,1 *n*-HCl oder 0,1 *n*-NaOH weiter 24 Stunden lang im Eisschrank aufbewahrt wurde, um so die Reversibilität der verloren gegangenen Wirkung zu beobachten (Tabelle XII-B).

In den Versuchen betreffs der Aktivierbarkeit bzw. der resistenten Trypsinwirkung gegenüber Säure- oder Alkali-Behandlung wurden 2 ccm vorbehandelten Pankreassaftes (2fache Verdünnung) mit 0,016 g Cystein unter Umstellung auf P_H 5,5 mittels 0,1 *n*-HCl oder 0,1 *n*-NaOH 1 Stunde lang bei $37^\circ C$ gehalten, dann mit Wasser auf 10 ccm gebracht (10fache Verdünnung) und weiter bei $37^\circ C$ 23 Stunden lang aufbewahrt.

Die Enterokinase-Aktivierung geschah ebenso wie in der vorher angegebenen Weise, dass 2 ccm vorbehandelter Pankreassaft (2fache Verdünnung) mit 0,05 g Enterokinase in 8 ccm Wasser bei P_H 8 und $37^\circ C$ 30 Minuten lang stehen gelassen wurden. Als Kontrolle kam der nichtbehandelte Saft zur Verwendung.

In den Versuchen wurden je 3 ccm dieser mit Cystein oder Kinase behandelten Saftlösung (1:10) benutzt.

Versuchsansatz: Ebenso wie in Tabelle III.

Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei Ph 8 (cem 0,1 n-NaOH)														
Behandlungsdauer														
1 Stdn. (37°C)			2 Stdn. (37°C)			5 Stdn. (37°C)			24 Stdn. (37°C)			Kontrolle mit frischem Pankreassaft ohne Behandlung		
Ph-Werte des Behandlungsmediums (37°C)	Zeit (Stdn.)	Aktivierung						Aktivierung						
		Aktivierung		Aktivierung		Aktivierung		Aktivierung		Aktivierung		Aktivierung		
		Ohne	Mit Säure-Cystein	Mit Kinasepulver 0,05 g	Ohne	Mit Säure-Cystein	Mit Kinasepulver 0,05 g	Ohne	Mit Säure-Cystein	Mit Kinasepulver 0,05 g	Ohne	Mit Säure-Cystein	Mit Kinasepulver 0,05 g	
Ph 3	5	0	0	0,28	0	0	0,26	0	0	0,22	0	0	0	0,10
	24	0	0	0,61	0	0	0,59	0	0	0,51	0	0	0	0,49
	72	0,05	0,04	0,77	0,05	0	0,71	0,03	0	0,70	0	0	0	0,63
Ph 4	5	0	0	0,45	0	0	0,43	0	0	0,36	0	0	0	0,33
	24	0	0	0,62	0	0	0,53	0	0	0,53	0	0	0	0,50
	72	0,09	0,05	0,85	0,05	0	0,73	0,04	0	0,67	0,05	0	0	0,51
Ph 10	5	0,08	0,73	0,82	0,08	0,7	0,86	0,1	0,73	0,86	0,20	0,75	0,90	—
	24	0,21	1,0	1,09	0,21	1,02	1,08	0,32	1,01	1,11	0,50	1,03	1,11	—
	72	0,64	1,17	1,2	0,64	1,17	1,25	0,70	1,21	1,25	0,77	1,25	1,27	—
Ph 12	5	0	0,09	0,25	0	0,02	0,24	0	0	0,11	0	0	0	—
	24	0	0,19	0,47	0	0,09	0,39	0	0	0,34	0	0	0	—
	72	0,05	0,28	0,55	0,02	0,18	0,47	0	0,09	0,36	0	0	0	—
Kontrolle (Nicht behandelt)	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
	24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,05
	72	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,20
														0,04
														0,26
														0,68
														0,75
														0,88
														0,91
														0,87
														0,91
														1,01
														1,11
														1,18
														1,05
														1,05

TABELLE XIII.

*Das Verhalten der durch Säure-Cystein und der durch Enterokinase
aktivierbaren Faktoren der tryptischen Wirkung des
Pankreassaftes gegenüber Kieselgur-
Adsorption bei P_H 4.*

Nachdem man die trübe Ausscheidung, die in der Lösung von 10 ccm Pankreassaft und 10 ccm Wasser beim Ansäuern bei P_H 5,5 mittels 0,1 *n*-HCl auftrat, abzentrifugiert hatte, unterwarf man die von der Ausscheidung getrennte Lösung nach Einstellung bei P_H 4 der Adsorption mit 0,1 g Kieselgur. Nach Umrühren bei Eistemperatur im Eiswasser (25 Min. lang) wurde das Adsorptionsgemisch in der Zentrifuge (2500 Drehungen pro Min.) 5 Minuten lang abgeschleudert und in Restlösung und Bodensatz getrennt, welcher letzterer mit P_H 4-Pufferlösung gewaschen, dann in Wasser suspendiert und unter Umstellung mit 0,1 *n*-NaOH auf P_H 8 mit Wasser auf 20 ccm gebracht wurde. Nach gutem Umrühren zentrifugierte man diese Suspension ab. Die so abgetrennte obere Flüssigkeit gelangte als Eluat zur Verwendung. Für die Säure-Cystein-Aktivierung wurden 2 ccm Restlösung oder Eluat (einer 2fach verdünnten Saftlösung entsprechend) mit 0,016 g Cystein-HCl unter Einstellung bei P_H 5,5 mit 0,1 *n*-HCl bei 37°C 24 Stunden lang aufbewahrt.

Für die Enterokinase-Aktivierung wurden 2 ccm Saftlösung mit 0,05 g Kinasepulver bei P_H 8 und 37°C 30 Min. lang behandelt.

Versuchsansatz: 20 ccm 1%ige Kasein (Hammarsten)-Citratpufferlösung + 2 ccm Saftlösung (entsprechend einer 2fach verdünnten Saftlösung) + 1 ccm Citratpuffer; P_H 8, 37°C.

Bei der Kontrolle ohne Adsorption brauchte man auch eine mit Wasser aufs 2fache verdünnte Pankreassaftlösung.

Um irgendeine direkt aktivierende Wirkung der Adsorption auf den inaktiven Saft auszuschliessen, wurde je 1 ccm Pankreassaft mit 0,01 g Adsorbens in 9 ccm Wasser bei P_H 8 und 37°C 30 Min. lang gehalten und dann auf seine Aktivität hin im gleichen Ansatz geprüft. Die Ergebnisse zeigen fast keine Aktivierung; sie sind wie folgt: Aciditätszunahme nach 24- und 72stündiger Diges-

tion bei Kieselgur 0,12 u. 0,3, bei Tierkohle 0,14 u. 0,31 und bei Tonerde 0,11 u. 0,29 cem 0,1 *n*-NaOH respektive.

Versuche	Zeit (Std.n.)	Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei P _H 8 (cem 0,1 <i>n</i> -NaOH)								
		Kontrolle ohne Adsorption			Restlösung der Kieselgur-Adsorption (P _H 4)			Eluat (P _H 8)		
		Nicht aktiviert	Mit Säure-Cystein bei P _H 5,5	Mit Kinasepulver bei P _H 8	Nicht aktiviert	Mit Säure-Cystein bei P _H 5,5	Mit Kinasepulver bei P _H 8	Nicht aktiviert	Mit Säure-Cystein bei P _H 5,5	Mit Kinasepulver bei P _H 8
1	5	0,15	0,9	1,01	0,1	0,22	0,7	0	0,04	0,21
	24	0,63	1,14	1,2	0,37	0,39	0,8	0	0,14	0,54
	72	0,94	1,29	1,3	0,67	0,68	0,91	0,06	0,21	0,71
11	5	0,13	0,88	0,93	0,18	0,2	0,82	0	0	0,61
	24	0,6	1,15	1,21	0,57	0,59	0,9	0,06	0	0,74
	72	0,95	1,27	1,26	0,68	0,69	0,94	0,11	0,06	0,77

ÜBER DIE AKTIVIERUNG DER TRYPTISCHEN WIRKUNG DES PANKREASSAFTES DES HUNDES.

III. Mitteilung: Die Wirkung des Darmsaftes auf die Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.

VON

MASAMITI KAWAHARADA.

*(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Fakultät der
Kaiserlichen Tohoku-Universität (Sendai) und aus dem Utzino-
Laboratorium des Instituts für die Chemische Forschung
an der Kaiserlichen Universität Kyoto. Direktor:
Prof. Dr. S. Utzino.)*

(Eingegangen am 11. Mai 1943)

Im Jahre 1899 wies Schepowalnikow (1899) nach, dass reiner Pankreassaft tryptisch vollständig unwirksam ist und dass er nach Zugabe einer geringen Menge Darmsaft sowohl bei alkalischer als auch, und zwar noch besser bei neutraler und schwach saurer Reaktion aktiviert wird. Danach fanden Bayliss und Starling (1904) die Kinase lediglich als ein Sekretionsprodukt des Dünndarms, vor allem seines oberen Endes.

Diesen Angaben gegenüber standen die Beobachtungen von Waldschmidt-Leitz und Waldschmidt-Graser (1927), wonach in normalem, reinem Darmsekret aus einer Vellaschlinge vom Hunde nur das Erepsin, nicht aber die Enterokinase als ursprüngliches Sekretionsprodukt der Darmschleimhaut zu gelten hat; die Wirkung der Kinase ist entweder auf die Beimengung von Leucocyten aus den Follikeln der Darmwand zurückzuführen, was die Vellaschlinge betrifft, oder aber der Aktivator scheint vielmehr in Form einer Vorstufe aus der Pankreasdrüse abgesondert und in den Mucosazellen des Dünndarmes absorbiert zu werden, da nach Entfernung der Pankreasdrüse die Kinasemenge

in der Darmschleimhaut erheblich abnimmt.

Nachdem Verf. (1943) eine Säure-Cystein-Aktivierung des Pankreassaftes aufgefunden hatte, hat er weiter über die vergleichenden Untersuchungen über die Kinase-Aktivierung in der vorigen Abhandlung berichtet und auf eine andere Aktivierbarkeit des Saftes durch Kinase hingewiesen. Daraufhin taucht nun hier eine neue Frage auf, ob nicht der frische Darmsaft aktivierend auf den Pankreassaft wirkt.

In der vorliegenden Arbeit beschäftigte Verf. sich unter Leitung von Prof. Dr. Utzino mit dem Studium der Darmsaft-Wirkung bei der Pankreassaft-Aktivierung. Den Darmsaft gewann man aus der einem Hunde angelegten Thiry-Vellaschen Schlinge nach einer gewöhnlichen Mahlzeit mit Fleisch-Reis und Milch, nachdem man die Schlingenumen mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespült hatte.

Die Resultate ergaben, dass der frische unaktive Pankreassaft durch eine kleine Menge Darmsaft (bei 37°C 30 Min.) aktiviert werden konnte, und zwar dass 0.05 ccm Darmsaft für die Aktivierung von 1 ccm Pankreassaft ausreichend zu sein schien (Tabelle I). In Hinsicht der Darmsaft-Wirkung wurden hier in der Hauptsache Beziehungen der Erepsinwirkung auf die Aktivierung studiert, da die Proteolyse bei der Trypsinogen-Aktivierung nach Northrops Ansicht eine grosse Rolle spielen sollte.

Zuerst kam Resistenz der aktivierenden Wirkung in Betracht, um dann die Erepsinwirkung auszuschliessen, da sie sich im allgemeinen als sehr labil erwies. Die aktivierende Wirkung des Darmsaftes ging grösstenteils durch Erhitzen bei 70°C (30 Min.) verloren, bei 60°C (30 Min.) blieb sie jedoch noch erhalten (Tabelle II).

Der getrocknete Darmsaft wirkte auch aktivierend auf den Saft, obwohl die Wirkung beim Trocknen ziemlich eingebüsst hat (Tabelle III).

Da schon Matsuo (1941) über die Kaseinase-Wirkung des Darmsaftes berichtet hatte, muss man sie zuerst ausschliessen. Um auch eine Frage, ob nicht Erepsin-Wirkung etwas mit der aktivierenden Wirkung zu tun hat, zu beantworten, kommt eine

Ausschaltung der Erepsin-Wirkung in Betracht. Aus den Resultaten in Tabelle IV ersieht man, dass der Darmsaft, der nach Aufbewahren bei $\text{pH } 4$ ($37^\circ\text{C } 20 \text{ Min.}$) nicht mehr ereptisch aktiv war, auch noch aktivierend auf den Pankreassaft wirkte in dem Masse, wie die Enterokinase oder der nicht behandelte Darmsaft.

Was nun eine Ausschaltung der Kaseinase, Peptonase und Dipeptidase anbetrifft, so sind die Resultate in Tabelle V hier anzuführen. Diese Wirkungen gingen schon nach Stehenlassen bei $\text{pH } 4$ (20 Min.) verloren, während der Darmsaft noch als Aktivator wirken konnte.

Bezüglich des pH -Optimums bei der Darmsaft-Aktivierung auf den Pankreassaft zeigt die Tabellenangabe einen pH -Bereich von $\text{pH } 6$ – $7,5$, indem bei $\text{pH } 5,5$ und auch bei $\text{pH } 8$ eine deutliche Aktivierung besonders nach langfristiger Digestion zutage trat. Der erepsinfreie Darmsaft schien am günstigsten bei $\text{pH } 6$ und 7 einzuwirken (Tabelle VI). Dies pH -Optimum ist anders als dasjenige bei der Säure- oder Kinase-Aktivierung, da die Säure-Aktivierung am stärksten bei $\text{pH } 5,5$ und die Kinase-Aktivierung noch bei $\text{pH } 8$ auftreten konnte.

Hier sei noch besonders hervorgehoben, dass der Pankreassaft, der durch Behandeln bei $\text{pH } 4$ ($37^\circ\text{C } 2 \text{ Stdn.}$) von der Säure-Cystein-Aktivierbarkeit befreit wurde, noch durch die Kinase aktivierbar war, nicht aber durch den Darmsaft (Tabelle VI). Diese Beobachtungen schienen in dieser Hinsicht darüber zu sprechen, dass die durch Darmsaft aktivierbare Komponente des Pankreassaftes etwas anders als das durch Kinase aktivierbare sein mag und derjenigen, die durch Säure-Cystein aktivierbar ist, ähnelt, oder, dass der Aktivator im Darmsaft nicht identisch mit demjenigen der Mucosa sein kann. Die Frage, ob im Darmsaft irgendeine Protease-Wirkung, die besonders für Proteine des Pankreassaftes bei $\text{pH } 6$ – 7 eingestellt ist, vorhanden ist, bleibt noch offen.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Hier wurden Untersuchungen über die aktivierende Wirkung des Hundedarmsaftes, der aus der Thiry-Vellaschen Schlinge gesammelt wurde, auf unaktiven Hunde-Pankreassaft

vorgenommen. Nach Zugabe von 0,05 ccm Darmsaft zeigte 1 ccm Pankreassaft eine solche Aktivität, dass sie durch weiteren Zusatz von Enterokinase nicht mehr zunahm.

Der grösste Teil des Aktivators im Darmsaft ging durch Hitze bei 70°C (30 Min.) verloren, bei 60°C aber blieb er erhalten.

Getrockneter Darmsaft entfaltete auch ein bestimmtes Aktivierungsvermögen.

2. Während die Erepsin- wie auch Kaseinase-Wirkung des Darmsaftes durch Aufbewahrung desselben bei P_H 4 (37°C 20 Min.) verloren gingen, blieb der Aktivator noch erhalten. Daraufhin nahm Verf. an, dass die aktivierende Wirkung fast nichts mit der Wirkung dieser bekannten Proteasen zu tun habe.

3. Die optimale Reaktion bei der Aktivierung durch Darmsaft liegt bei P_H 6–7,5, und zwar beobachtet man sie auch durch erepsinfreien Saft bei P_H 6–7. Diese Reaktion ist weder dieselbe wie die bei der Säure-Cystein-Aktivierung noch die bei der Kinase-Aktivierung.

4. Hier sei auch hervorgehoben, dass der Darmsaft nicht mehr imstande war, einen solchen Pankreassaft, der nach dem Aufbewahren bei P_H 4 (37°C 2 Stdn.) nicht mehr durch Säure-Cystein, sondern nur noch durch Kinase aktivierbar war, zu aktivieren. Auf Grund dieser Beobachtungen kann Verf. nicht die Vermutung unterdrücken, dass die durch Kinase aktivierbare Komponente eine etwas andere als die durch Säure-Cystein oder die durch Darmsaft aktivierbare zu sein scheint, und dass der Darmsaftaktivator nicht identisch sein dürfte mit dem der Enterokinase noch wohl auch mit dem bei der Säure-Cystein-Aktivierung. Die Frage, ob sich eine besondere Proteasenwirkung bei P_H 6–7 im Darmsaft befindet blieb noch offen.

Dem Unterrichtsministerium sei an dieser Stelle bestens gedankt für die Gewährung einer Unterstützung zur Anregung wissenschaftlicher Forschung.

Prof. Dr. S. Utzino.

LITERATUR.

- Bayliss, W. M. u. Starling, E. H. (1904): Journ. Physiol., **30**, 61.
 Kawaharada, M. (1943): Dieses Journ., **36**, 457 u. 485.
 Matsuo, M. (1941): Dieses Journ., **33**, 97.
 Northrop, J. H. (1939): Crystalline Enzymes, New York.
 Schepowalnikow, N. P. (1899): Malys Jahresber., **29**, 378.
 Waldschmidt-Leitz, E. u. Waldschmidt-Graser, J. (1927): Zeits.
 f. physiol. Chem., **166**, 247.

Versuchsteil.**TABELLE I.**

Einfluss des frischen Hunde-Darmsaftes auf die Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.

Nachdem man die Schlingenlumen mit 500 ccm lauwarmer physiologischer Kochsalzlösung vorsichtig ausgespült hatte, sammelte man den Darmsaft aus der Thiry-Vellaschen Schlinge des Hundes nach einer gewöhnlichen Mahlzeit, bestehend aus Fleisch-Reis und Milch, und schleuderte ihn von den Formelementen ab. Der unaktive Pankreassaft, gewonnen aus der Pankreasfistel, diente uns zum Versuch. Beim Aktivierungsverfahren hat man 1 ccm Pankreassaft mit von 0,001 bis 0,5 ccm Darmsaft, der aus der Thiry-Vellaschen Schlinge gewonnen und mit Wasser (also mit 8,5 bis 8,9 ccm Wasser) auf 9 ccm aufgefüllt worden war, versetzt und bei 37°C 30 Min. lang aufbewahrt. Je 3 ccm Saftlösung, die aus 1 Teil Pankreassaft und 9 Teilen Darmsaft-Wasser bestand, kamen bei den Versuchen zur Verwendung.

Versuchsansatz: 20 ccm 1%ige Kaseinlösung (Hammarsten) + 3 ccm Saftlösung + 2 ccm Puffer (insgesamt also 25 ccm); digerierte unter Toluol bei P_H 8 und bei 37°C. Allgemeine Kontrolle mit Enzym ohne Kasein. Nach Abzug dieser Kontrollwerte von den Hauptwerten fand die Eintragung in die Tabelle statt. Als besondere Kontrollversuche wurden hier die Wirkung des Pankreassaftes ohne Darmsaft einerseits und auch die des Darmsaftes ohne Pankreassaft andererseits geprüft.

Zeit (Stdn.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei PH 8 (ccm 0,1 <i>n</i> -NaOH)								
	Kontrolle		Aktivierung des Pankreassaftes durch Darmsaft						
	Pankreassaft ohne Darmsaft	Darmsaft (1,0 ccm) ohne Pankreassaft	Darmsaft-Menge (ccm) für 1 ccm Pankreassaft						
			0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,0025	0,001
5	0,01	0,01	0,89	0,89	0,81	0,43	0,22	0,12	0,09
24	0,07	0,11	1,17	1,16	1,02	0,8	0,62	0,49	0,34
72	0,21	0,4	1,33	1,25	1,12	1,05	0,88	0,76	0,68

TABELLE II.

*Thermostabilität der aktivierenden Wirkung des
Darmsaftes gegenüber Pankreassaft.*

Je 0,5 ccm Darmsaft wurde mit 8,5 ccm Wasser in einem Reagensglas, das sich in einem Wasserbade von bestimmter Temperatur befand, 30 Min. lang stehen gelassen, worauf 9 ccm dieser erhitzten Darmsaftlösung weiter mit 1 ccm Pankreassaft bei 37°C 30 Min. lang aufbewahrt wurden, um alsdann die aktivierende Wirkung des erhitzten Darmsaftes zu prüfen.

Versuchsansatz: 20 ccm 1%ige Kaseinlösung + 3 ccm Saftlösung (1:10); mit Puffer auf 25 ccm gebracht und bei PH 8 unter Toluol bei 37°C digeriert.

Allgemeine Kontrolle mit Enzympuffer ohne Kasein.

Zeit (Stdn.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei PH 8 (ccm 0,1 n-NaOH)					
	Kontrolle mit Pankreassaft		Aktivität des Darmsaft-Pankreassaft- systems nach Hitze-Wirkung auf Darmsaft			
	Ohne Darmsaft	Mit 0,5 ccm frischem Darmsaft aktiviert	Erhitzung bei 50°–80°C (30 Min.)			
			50°	60°	70°	80°
5	0,01	0,89	0,64	0,64	0,01	0
24	0,07	1,17	0,87	0,84	0,12	0,04
72	0,31	1,33	1,1	1,06	0,54	0,3

TABELLE III.

*Einfluss des getrockneten Darmsaftes auf die Aktivierung der
tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.*

Der frische Darmsaft wurde im Vakuumexsikkator über P₂O₅ getrocknet und pulverisiert. Beim Gebrauch wurde das Pulver in der originalen Volummenge Wasser wieder aufgelöst und 0,1 oder 0,5 ccm dieser Lösung mit 1 ccm Pankreassaft (unaktiv) und 9 ccm Wasser bei 37°C 30 Min. lang aufbewahrt.

Versuchsansatz: Ebenso wie in Tabelle I.

Substrate	Aciditätszunahme in 5 cem Digestat bei P _H 8 (cem 0,1 n-NaOH)				
	Zeit (Std.)	Kontrolle mit Pankreassaft		Aktivierung durch getrock- neten Darmsaft, der einer Saftmenge entspricht	
		Ohne Darmsaft	Mit 0,1 cem frischem Darmsaft aktiviert	0,5 cem	0,1 cem
Kasein (Hammarsten) (0,8%)	5	0,04	0,88	0,66	0,59
	24	0,1	1,01	0,79	0,8
	72	0,26	1,19	1,01	0,92
20 cem 2%iger Pepton-S-Citrat- puffer + trockener Darmsaft, mit Puffer auf 25 cem gebracht (P _H 7,5)	Erepsin-Wirkung (P _H 7,5)				
	5	—	—	0,08	0,02
	24	—	—	0,26	0,09
	72	—	—	0,48	0,24

TABELLE IV.

Einfluss des erepsinfreien Darmsaftes auf die Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes.

Für die Inaktivierung der Erepsinwirkung des Darmsaftes wurde der Saft mit HCl bei P_H 4 eingestellt und bei 37°C verschieden lange Zeit stehen gelassen.

Den Aktivierungsansatz, der aus 1 cem Pankreassaft, 0,5 cem Darmsaft, normal oder mit Säure behandelt, und 8,5 cem Wasser bestand, liess man bei 37°C 30 Min. lang stehen und je 3 cem Saftlösung benutzen.

Versuchsansatz: Ebenso wie in der Tabelle III. Für die Erepsinprüfung wurden 20 cem 2%iger Pepton · S-Citratpuffer und 2 cem Darmsaft mit Wasser auf 25 cem gebracht und bei P_H 7,8 und 37°C unter Toluol digeriert. Allgemeine Kontrolle mit Enzym-Citratpuffer ohne Pepton. Die Angaben wurden für die Tabelle korrigiert.

Substrate	Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Digestat bei P_H 8 (ccm 0,1 <i>n</i> -NaOH)					
		Kontrolle mit Pankreassaft			Aktivierung durch mit Säure behandelten Darmsaft		
		Ohne Darmsaft	Mit 0,5 ccm Darmsaft aktiviert	Mit 0,05 g Kinase- pulver aktiviert	Aufbewahrung bei P_H 4 mit HCl		
					20 Min.	30 Min.	60 Min.
Kasein (Hammar- sten) (0,8%)	5	0,01	0,76	0,58	0,68	0,47	0,06
	24	0,07	1,03	0,78	1,04	0,87	0,32
	72	0,2	1,16	1,04	1,16	1,05	0,66
Erepsin-Prüfung (P_H 7,8)							
Pepton-S (1,6%)	5	—	—	—	0	—0,01	0
	24	—	—	—	0	0	0
	72	—	—	—	0,01	0	0,01

TABELLE V.

*Proteasen-Wirkung des bei P_H 6,0 und P_H 4,0 behandelten
Darmsaftes des Hundes (Säure-Inaktivierung des
Darmerepsins).*

Den frischen Darmsaft liess man nach Ansäuern mit 0,1 *n*-HCl bei P_H 4 oder 6 und bei 37°C 20 oder 30 Min. lang respektive stehen; je 1 ccm Darmsaft wurde dann mit 20 ccm 1%iger oder 0,05 Mol-Substrat-Citratpufferlösung (P_H 7,8) und mit Citratpuffer auf 25 ccm gebracht und unter Toluol bei 37°C digeriert, um die Kaseinase- und Erepsinwirkung zu untersuchen.

Allgemeine Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne Substrat. Die korrigierten Werte sind in der Tabelle angegeben.

Substrate	Aciditätszunahme in 5 ccm Digestat bei P _H 7,8 (ccm 0,1 n-NaOH)			
	Zeit (Stdn.)	Nicht behandelt	Darmsaft inaktiviert bei	
			P _H 6 (30 Min.)	P _H 4 (20 Min.)
Kasein (Hammarsten) (0,8%)	5	0	0	0
	24	0,13	0,15	0,06
	72	0,46	0,42	0,19
Pepton-Witte (0,8%)	5	0,32	0,32	0
	24	0,67	0,66	0
	72	1,04	0,99	0
Glycylglycin (1/25 Mol)	5	0,2	0,2	0
	24	0,55	0,4	0
	72	1,2	0,88	0

TABELLE VI.

*Einfluss des Darmsaftes auf die Aktivierung der tryptischen
Wirkung des Pankreassaftes.*

Um die Erepsinwirkung des Darmsaftes zu inaktivieren, liess man den Saft bei P_H 4 und 37°C 20 Min. lang stehen. In den Aktivierungsversuchen wurde je 1 ccm frischer inaktiver Pankreassaft mit 0,2 ccm des nichtbehandelten (I) oder des erepsinfreien Darmsaftes (II) und mit 8,8 ccm Wasser vermischt (10fache Verdünnung) und sodann bei verschiedenen P_H-Werten bei 37°C 30 Min. lang stehen gelassen und weiter auf seine Trypsin-Aktivität hin geprüft. Bei den anderen Versuchen (III) wurde auch der Pankreassaft herangezogen, der (15 ccm Saft + HCl + Wasser = 30 ccm) zwar durch 2stündiges Aufbewahren bei P_H 4 und 37°C von der Säure-Cystein-Aktivierbarkeit befreit worden war, durch Enterokinase jedoch noch aktivierbar war, indem je 2 ccm dieser Pankreassaftlösung mit 0,2 ccm Darmsaft und 7,8 ccm Wasser bei verschiedenen P_H-Werten 37°C 30 Minuten lang behandelt wurden, um die Aktivierbarkeit dieses behandelten Pankreassaftes durch Darmsaft zu untersuchen.

Versuchsansatz: 20 cem Kaseinpufferlösung + 3 cem Pankreassaftlösung (1:10) + 2 cem Puffer.

Allgemeine Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne Kasein. Die Tabelle gibt die korrigierten Werte.

Pankreassaft und Darmsaft	Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei PH 8 (cem 0,1 n-NaOH)											
	Zeit (Stdn.)	Kontrolle mit Pankreassaft ohne Darmsaft			PH-Werte bei der Aktivierung des Pankreassaftes durch Darmsaft (37°C, 30 Min.)							
		Nicht aktiviert	Mit Kinase- pulver (PH 8, 37°C, 30 Min.)	Mit Säure-Cystein (PH 5,5, 37°C, 24 Stdn.)	4	5	5,5	6	7	7,5	8	9
I Pankreassaft mit Darmsaft	5	0	0,88	0,7	0	0,05	0,19	0,68	0,78	0,67	0,32	0,05
	24	0,02	1,0	0,9	0,03	0,17	0,68	1,08	0,98	0,92	0,81	0,5
	72	0,09	1,11	1,1	0,2	0,58	1,03	1,25	1,17	1,15	1,11	0,9
II Pankreassaft mit creptasefreiem Darmsaft	5	0	0,86	0,73	0	0	0,1	0,69	0,49	0,2	0,05	0
	24	0,06	1,02	0,91	0,03	0,19	0,37	0,93	0,88	0,7	0,32	0,27
	72	0,22	1,12	1,11	0,27	0,57	0,78	1,13	1,03	0,95	0,79	0,7
III Der mit Säure (PH 4) behandel- te Pankreassaft mit Darmsaft	5	0	0,46	0	0	0	0	0,03	0,03	0,02	0	0
	24	0,02	0,67	0	0	0	0,05	0,09	0,08	0,08	0,07	0,02
	72	0,1	0,81	0,04	0,1	0,12	0,13	0,28	0,22	0,2	0,2	0,2



ÜBER DIE AKTIVIERUNG DER TRYPTISCHEN WIRKUNG DES PANKREASSAFTES DES HUNDES.

IV. Mitteilung: Die Wirkung der Gewebemazeration auf die Aktivierung des Pankreassaftes.

VON

MASAMITI KAWAHARADA.

*(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Fakultät der
Kaiserlichen Tohoku-Universität (Sendai) und aus dem Utzino-
Laboratorium des Instituts für die Chemische Forschung
an der Kaiserlichen Universität Kyoto.
Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)*

(Eingegangen am 11. Mai 1943)

In Erweiterung der Untersuchungen über die Aktivierungsweise des Pankreassaftes unternahm Verf. hier unter Leitung von Prof. Dr. S. Utzino Versuche mit verschiedenen Gewebemazerationen. Was die aktivierende Wirkung der Gewebestandteile, die nicht zu den Verdauungsdrüsen gehörten, auf den inaktiven Pankreassaft anbelangt, so sind die Angaben von Délezenne et al. (1902 u. 1903) zu erwähnen, denen zufolge die Kinase aus den weissen Blutzellen und den lymphatischen Ganglien stammte.

Anschliessend an diese Beobachtung äusserten Waldschmidt-Leitz und Waldschmidt-Graser (1927) die Ansicht, dass der aktivierende Faktor des Darmsaftes, welcher aus einer Vellaschen Schlinge des Hundes gewonnen wurde, auch auf die Leucocyten der Mucosafollikel zurückzuführen, nicht aber als Sekretionsprodukt des Darmsaftes zu betrachten sei.

Bei den Versuchen mit Nieren-, Milz- und Magenmucosa-Mazeration hat Itzioka (1937) im hiesigen Institut darauf aufmerksam gemacht, dass der Pankreassaft des Kaninchens, der mit dieser Gewebemazeration bei Raumtemperatur 30 Min. lang stehen gelassen und dann benutzt wurde, eine deutliche Aktivitätszunahme

im 72stündigen Digestat mit Kasein zeigte, während Trockenpräparate dieser Organe keine solche Wirkung zu entfalten vermochten. Da hier aber keine Rücksicht auf so wichtige Bedingungen wie PH-Wert, Temperatur und Wirkungsdauer genommen wurde, erhielt man keine übereinstimmenden Ergebnisse, wenngleich diese auch viel Interessantes betreffs der aktivierenden Wirkung der Gewebemazeration erwarten lassen.

Zuletzt sei hier auch nicht unerwähnt gelassen, dass Kunitz (1938) eine Penicillium-Kinase entdeckte, die bei PH 3 auf kristallinisches Trypsinogen stark aktivierend wirkte und die selbst sich als proteolytisch erheblich aktiv erwies.

In den vorangegangenen Abhandlungen hat Verf. (1943) über die Säure- und Darmsaftaktivierung berichtet, indem er dabei darauf aufmerksam gemacht hatte, dass die Säure-Aktivierung sich etwa auf ein Proteolysensystem bei saurer Reaktion beziehen muss.

In Fortführung dieser Arbeit taucht hier eine neue Frage auf, wie die Gewebemazeration verschiedener Herkunft auf die Aktivierung des Saftes einwirkt.

In vorliegender Arbeit standen Leber-, Nieren- und Milzmazeration, die aus 1 Teil Organbrei und 3 Volumteilen Glycerin-Wasser bestand, bei den Versuchen zur Verfügung und die Ergebnisse fasst Verf. hier kurz wie folgt zusammen.

Durch Einwirkung der Gewebemazeration wie Leber- und Nierenmazeration (bei 37°C 30 Min.) trat die Aktivierung des Pankreassaftes am stärksten bei PH 5,0 und 5,5 zutage, etwas schwächer aber durch die Milzmazeration (Tabelle I).

Nach 24stündiger Behandlung mit dieser Mazeration zeigte der Pankreassaft eine gleich starke Tryptaseaktivität wie der nach Kinaseaktivierung. Bei kurzfristiger Einwirkung (wie 30 Min.) trat die Tryptaseaktivität aber nur etwas schwächer auf. Daher ähnelt diese Aktivierung des Saftes mit der Gewebemazeration der Säure-Cystein-Aktivierung, ist also stärker als Säure- und etwas schwächer als Kinase-Aktivierung (Tabelle II). Die Milzmazeration schien im allgemeinen schwächer einzuwirken.

Aus diesen Beobachtungen entsteht weiterhin die Frage, wie man zwischen Säure-Cystein-Aktivierung und Gewebemazeration-

Aktivierung unterscheiden soll und ob man die letztere als eine spezifische Wirkung der Gewebemazeration betrachten kann, da das Vorhandensein des Cysteins oder einer ähnlichen Substanz in Gewebemazerationen berücksichtigt werden muss. Bei den Versuchen mit Lebermazeration, die mit Cystein bei $\text{PH } 6$ 30 Min. lang behandelt und dann als Aktivator für den inaktiven Saft geprüft wurde, trat die stärkste Aktivierung bei $\text{PH } 5$ ($37^\circ\text{C } 30$ Min.) auf und der Spaltungswert des aktivierten Saftes war nicht grösser als derjenige des mit der Mazeration ohne Cystein behandelten Saftes (Tabelle III). Aus den hier erzielten Resultaten ersieht man ferner, dass die Gewebemazerationen als Aktivator des Saftes bei schwach alkalischer Reaktion ($\text{PH } 8$) fast keine besondere Rolle zu spielen schienen und daraufhin möchte Verf. mit grösster Wahrscheinlichkeit annehmen, dass die Gewebeereptase, die stets als starke Peptonase bzw. Peptidase bei alkalischer Reaktion in Betracht kommt, für die Aktivierung des Pankreassaftes nicht viel Bedeutung habe, insofern irgendeine Protease als Aktivator bei der Aktivierung in Betracht kommt. Die schwache Aciditätszunahme im Digestat mit dem bei $\text{PH } 8$ behandelten Saft kann Verf. entweder aus sekundärer Aktivierung bei der Digestion oder aus abgeschwächter Wirkung des Gewebe-Aktivators erklären.

Hier kommt die Katheptase als solche in Frage. Da schon über die Trennung der Kathopeptonase von der Kathoproteinase (Utzino u. Sakai (1941), Sakai (1943)) berichtet worden war, führte Verf. hier die Versuche mit Leberpulvern aus, die einmal von der letzteren befreit wurden.

Tabelle IV ergab, dass die kathepsinfreien aber noch kathopeptonasehaltigen Leberpulver sich als minderwertige Aktivatoren erwiesen, die Leberpulver, die noch katheptasehaltig waren, jedoch bei $\text{PH } 4,5$ besonders nach Cysteinzusatz deutlich aktivierend wirkten (Tabelle IV). Die Pankreassaft-Wirkung mit kathepsinfreiem Leberpulver mag vielleicht aus schwacher Säure- oder Säure-Cystein-Wirkung bei $\text{PH } 4,5$ –5 herrühren, obgleich in diesem Leberpulver eine Kathopeptose-Wirkung erhalten blieb. Auf Grund dieser Ergebnisse möchte Verf. hier wohl eine Kathepsin-Wirkung (Kathoproteinase) bei der Aktivierung des Pankreassaftes berück-

sichtigen.

Daraufhin wurde hier die aktivierende Wirkung des Kinasepulvers, des Säure-Cysteins, des Darmsaftes, des Katheptase-Cysteins und des Kathopeptonase-Cysteins vergleichend untersucht (Tabelle V). In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Tabelle IV wirkte das Katheptase-Cystein (37°C 30 Min.) deutlich aktivierend auf den Pankreassaft bei pH 4,5, die Kathopeptonase, die frei von Kathoproteinase war und mit Cystein behandelt wurde, aber nicht.

Hier sei besonders hervorgehoben, dass diese Leberkatheptase nicht mehr imstande war, den Pankreassaft zu aktivieren, der vorher mit Säure bei pH 4 (37°C 2 Stdn.) behandelt worden und nur durch die Enterokinase aktivierbar war. Wie schon in der II. Mitteilung (1943) beschrieben worden war, wirkten Säure-Cystein und Darmsaft nicht aktivierend auf den mit Säure behandelten Pankreassaft. In dieser Hinsicht scheint die Einstellung des Gewebe-Aktivators (Leberkatheptase) in ähnlichem Sinne mit dem Darmsaft oder Säure-Cystein einzuwirken. Da das pH -Optimum für diese drei Aktivatoren in der Hauptsache bei saurer Reaktion liegt, obwohl es nicht ganz übereinstimmt, möchte Verf. sie als saure Aktivatoren des Pankreassaftes auffassen.

Zuletzt ist hier zur Kontrolle zu erwähnen, dass die Gewebepulver, die nach Aufbewahrung in Alkohol 24 Stunden lang bereitet und als Aktivator geprüft wurden, weder Proteinase- noch Peptonase-Wirkung bei pH 7,5, jedoch nur Dipeptidase-Wirkung zeigten (Tabelle VI).

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Diese Arbeit bietet in der Hauptsache eine vergleichende Beobachtung der aktivierenden Wirkung der Gewebemazeration auf unaktiven Pankreassaft mit den in den vorigen Abhandlungen publizierten Aktivatoren (Kawaharada, 1943).

Leber-, Nieren- und Milz-Mazeration wirkten auf unaktiven Pankreassaft des Hundes aktivierend, und zwar war die Wirkung am günstigsten bei pH 5–5,5, während fast keine bei pH 8 konstatierbar war. Dauerte die Wirkung der Mazeration bei pH 5

und bei 37°C 20 Stunden lang, so erreichte der Pankreassaft einen ebensolchen Aktivitätsgrad, wie der mit Kinase aktivierte Saft. Kurzfristige Aufbewahrung (30 Min.) rief eine partielle Aktivierung hervor, welche der Säure-Cystein-Aktivierung ähnelte.

2. Während ereptasefreies, kathepsinfreies (kathoproteinase-freies) Leberpräparat nur geringfügig oder fast überhaupt nicht aktivierend auf Pankreassaft einwirkte, zeigte dasjenige, welches zwar von der Ereptase befreit, aber noch katheptasehaltig war, eine deutliche Aktivierung bei P_H 4,5, besonders nach Cystein-zusatz.

3. Ebenso wie dies bei dem Säure-Cystein oder Darmsaft der Fall war, vormochte die Lebermazeration oder das ereptasefreie Leberpräparat nicht, den bei P_H 4 (37°C 2 Stdn.) behandelten Pankreassaft zu aktivieren, welcher noch durch Enterokinase aktiviert werden konnte, wenngleich die Aktivität sich in erheblich geringerem Masse geltend machte. Da die Wirkung des kathepsinfreien Leberpräparats unter Cysteinzusatz bei P_H 4,5–5,0 (37°C 30 Min.) einer der Bedingungen bei der Säure-Cystein-Aktivierung entsprach und die dabei erreichte Aktivität viel niedriger als die bei der Aktivierung mit katheptasehaltigem Präparat war, möchte Verf. in der Lebermazeration ein stärkeres, aktivierendes Wirkungsvermögen annehmen, bei dem vielleicht die Kathepsinwirkung (Kathoproteinase) eine Rolle spielt, welcher Aktivierung jedoch der Säure-Cystein-Aktivierung des Pankreassaftes sehr nahe verwandt zu sein scheint. Da die katheptische Wirkung des Pankreassaftes mit der der Gewebekatheptase noch nicht sicher identifiziert werden konnte, bleibt die Frage nach der Einheitlichkeit beider Wirkungen noch offen.

Dem Unterrichtsministerium sei hier bestens gedankt für die Gewährung einer Unterstützung zur Anregung wissenschaftlicher Forschung.

Prof. Dr. S. Utzino.

LITERATUR.

- Délezenne, C. (1902): C. R. Soc. Biol., **54**, 283, 590, 693 u. 998.
Délezenne, C. u. Mouton, H. (1903): C. R. Soc. Biol., **55**, 27.
Itzioka, F. (1927): Dieses Journ., **26**, 37.
Kunitz, M. (1938): Journ. gen. Physiol., **21**, 601.
Kawaharada, M. (1943): Dieses Journ., **36**, 457, 485 u. 509.
Sakai, T. (1943): Dieses Journ., **36**, 383.
Utzino, S. u. Sakai, T. (1941): Dieses Journ., **33**, 457.
Waldschmidt-Leitz, E. u. Waldschmidt-Graser, J. (1927): Zeits.
physiol. Chem., **166**, 247.

Versuchsteil.

TABELLE I.

Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes durch Gewebemazeration (Leber, Niere und Milz) des Schweines bei verschiedenen PH-Werten.

Der Pankreassaft wurde aus der einem Hunde angelegten Pankreasfistel gewonnen. Zur Bereitung der Mazeration wurde 1 Teil Organbrei mit 3 Teilen Glycerin-Wasser gut zerrieben, koliert und unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt.

1 cem Pankreassaft liess man mit 0,2 cem Gewebemazeration (Organbrei: Glycerin-Wasser=1:3) und 8,8 cem Wasser unter Einstellung bei verschiedenen PH-Werten bei 37°C 30 Min. lang stehen, worauf je 3 cem Saftlösung, neutralisiert, zur Anwendung gelangten.

Versuchsansatz: 3 cem diese Saftlösung + 20 cem 1%ige Kasein-Pufferlösung, mit Puffer auf 25 cem gebracht und bei PH 8 unter Toluol digeriert.

Allgemeine Kontrolle mit Saftlösung-Puffer ohne Kasein.

Nach Abzug der Kontrollwerte wurden die korrigierten Werte des Hauptversuchs in der Tabelle angegeben.

Organe	Zeit (Stdn.)	Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei PH 8 (cem 0,1 n-NaOH)							
		PH-Werte bei der Aktivierung durch Gewebemazeration bei 37°C 30 Min. lang.							
		Ohne Gewebemazeration	PH 4,0	PH 4,5	PH 5,0	PH 5,5	PH 6,0	PH 7,0	PH 8,0
Lebermazeration	5	0,01	0,01	0,03	0,27	0,27	0,06	0,06	0,03
	24	0,1	0,07	0,16	0,69	0,65	0,21	0,25	0,2
	72	0,21	0,14	0,35	0,97	0,87	0,55	0,6	0,55
Nierenmazeration	5	0	0	0,04	0,31	0,31	0,07	0,03	0,01
	24	0,05	0,05	0,16	0,78	0,76	0,36	0,15	0,15
	72	0,23	0,24	0,36	1,18	1,16	0,97	0,69	0,69
Milzmazeration	5	0	0	0	0,1	0,09	0,01	0,01	0,06
	24	0,08	0,06	0,07	0,38	0,36	0,11	0,11	0,17
	72	0,25	0,2	0,27	0,8	0,77	0,45	0,44	0,5

TABELLE II.

*Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes
durch Leber-, Nieren- oder Milzmazeration des
Schweines bei P_H 5 und P_H 7.*

Die Gewebemazeration wurde mit 1 Teil Gewebebrei und 3 Volumteilen Glycerin-Wasser (1:1) hergestellt, ebenso wie in den Versuchen von Tabelle I.

Je 1 ccm Pankreassaft und 0,2 ccm Gewebemazeration wurden unter Einstellung mittels der Säure- oder Alkalilösung bei P_H 5 und 7 mit Wasser auf 10 ccm gebracht und bei 37°C 30 Minuten oder 24 Stunden lang stehen gelassen. Zum Vergleich wurde die bei P_H 5 behandelte Saftlösung weiter mit Enterokinasepulver (0,05 g für 10 ccm Saftlösung) bei P_H 8 und 37°C 30 Min. lang aktiviert.

Versuchsansatz: 3 ccm dieser Saftlösung + 20 ccm 1%iger Kaseinpufferlösung, mit Puffer auf 25 ccm gebracht und bei P_H 8 unter Toluol digeriert.

Allgemeine Kontrolle mit Saftlösung-Puffer ohne Kasein.

Aktivierungs- dauer bei PH 5 oder 7 37° C	Digestionszeit (Stdn.)	Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei PH 8 (cem 0,1 n-NaOH)											
		Gewebeaktivierung										Kontrolle	
		durch Lebernazeration		durch Nierenmazeration				durch Milzmazeration				Pankreassaft ohne Gewebe- mazeration	
		bei PH 5	bei PH 7	bei PH 5	bei PH 7	bei PH 5	bei PH 7	bei PH 5	bei PH 7	bei PH 5	bei PH 7		
		Enterokinaseeinfluss											
		Ohne Enterokinase	Mit Enterokinase	Ohne Enterokinase	Mit Enterokinase	Ohne Enterokinase	Mit Enterokinase	Ohne Enterokinase	Mit Enterokinase	Ohne Enterokinase	Mit Enterokinase	Ohne Enterokinase	
30 Minuten	5	0,54	0,86	0,07	0,58	0,84	0,08	0,2	0,8	0,06	0		
	24	0,82	0,96	0,26	0,86	1,01	0,34	0,59	0,97	0,22	0,03		
	72	1,05	1,18	0,6	1,23	1,27	0,88	0,8	1,04	0,42	0,19		
24 Stunden	5	0,65	0,65	—	0,64	0,69	—	0,57	0,6	—	—		
	24	0,78	0,85	—	0,93	0,95	—	0,72	0,72	—	—		
	72	0,97	0,96	—	1,14	1,14	—	0,87	0,9	—	—		

TABELLE III.

Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes durch die mit Cystein aktivierte Lebermazeration des Schweines bei verschiedenen PH-Werten.

Nachdem je 2 ccm Lebermazeration mit 2 ccm 0,1 Mol-Cystein-Lösung unter Einstellung bei PH 6 mittels einiger Tropfen 0,1 n-HCl bei 37°C 30 Min. lang behandelt wurde, fügte man zu 0,4 ccm dieser Lösung 1 ccm Pankreassaft und 8,6 ccm Wasser hinzu, um die Gesamtmenge auf 10 ccm zu bringen. Die Aufbewahrung dieses Gemisches bei 37°C dauerte bei verschiedenen PH-Werten 30 Min. lang.

Versuchsansatz: 3 ccm dieser mit Lebermazeration behandelten Saftlösung + 20 ccm 1%iger Kasein-Pufferlösung, mit Puffer auf 25 ccm gebracht und bei PH 8 unter Toluol digeriert.

Allgemeine Kontrolle mit Saftlösung-Puffer ohne Kasein.

Zeit (Stdn.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Kasein-Digestat bei PH 8 (ccm 0,1 n-NaOH)							
	PH-Werte bei der Aktivierung durch Lebermazeration-Cystein bei 37°C 30 Min. lang.							
	Ohne Leber- mazeration	PH 4,0	PH 4,5	PH 5,0	PH 5,5	PH 6,0	PH 7,0	PH 8,0
5	0	0,03	0,08	0,47	0,09	0,02	0,02	0
24	0,07	0,07	0,28	0,81	0,34	0,2	0,19	0,19
72	0,17	0,17	0,5	1,07	0,74	0,64	0,6	0,57

TABELLE IV.

Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes durch kathepsinfreies oder katheptasehaltiges Leberpulver des Schweines bei PH 4,5 oder PH 5.

Hier kamen das von Kathepsin (Kathoproteinase Sakai, 1943) befreite Leberpulver (Leber-Kathopeptonase) sowie das Leberpulver selbst (Leber-Katheptase) in Betracht. Man gebrauchte diese Pulver, indem man 1 ccm Pankreassaft mit 0,2 g Leberpulver in 9 ccm Wasser oder mit 4 ccm vorher mit Cystein aktivierter

Leberpulversuspension und 5 ccm Wasser bei P_{H} 4,5 oder P_{H} 5 $37^{\circ}C$ 30 Min. lang aufbewahrte. Je 3 ccm dieser Saftlösung wurden dann benutzt. Die Cystein-Behandlung geschah mit 0,2 g Leberpulver in 2 ccm Wasser und 2 ccm 0,1 Mol-Cystein-Lösung bei P_{H} 6 und $37^{\circ}C$, 30 Min. dauernd.

Versuchsansatz: 3 ccm Saftlösung + 20 ccm 1% Kasein-Pufferlösung, mit Puffer auf 25 ccm gebracht und bei P_{H} 8 unter Toluol digeriert.

Allgemeine Kontrolle mit Saftlösung-Puffer ohne Kasein.

Zeit (Std.n.)	Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei P _H 8 (cem 0,1 n-NaOH)								
	Kathepsinfreies Leberpulver				Katheptasehaltiges Leberpulver				Pankreassaft
	Pankreassaftaktivierung (37° 30 Min.)				Pankreassaftaktivierung (37° 30 Min.)				Ohne Behandlung mit Leberpulver
	bei P _H 4,5		bei P _H 5		bei P _H 4,5		bei P _H 5		
	Ohne Cystein	Mit Cystein	Ohne Cystein	Mit Cystein	Ohne Cystein	Mit Cystein	Ohne Cystein	Mit Cystein	
5	0	0,04	0	0	0,04	0,33	0,08	0,18	0
24	0,14	0,19	0,12	0,14	03,5	0,71	0,47	0,64	0,02
72	0,43	0,63	0,32	0,5	0,65	1,01	0,72	0,86	0,2

TABELLE V.

Aktivierung der tryptischen Wirkung des normalen oder mit Säure-Alkali behandelten Pankreassaftes durch Kinasepulver, Darmsaft (Hund), Säure-Cystein, Katheptase-Cystein (ereptasefreies Schweineleberpulver) oder Kathopeptonase-Cystein (ereptase- und kathepsinfreies Schweineleberpulver).

Als inaktiver Pankreassaft diente der normale oder der behandelte Saft, der (10 ccm) unter Einstellung mit Salzsäure bei P_{H} 4 oder mit Natronlauge und Wasser (ca. 10 ccm) bei P_{H} 12 bis auf das Doppelte verdünnt und während 2 bzw. 24 Stunden bei $37^{\circ}C$ aufbewahrt wurde.

Für die Enterokinase-Aktivierung (a) fügte man 0,05 g Kinase

entweder zu 1 ccm Pankreassaft in 9 ccm Wasser oder zu 2 ccm der bei der Behandlung aufs zweifache verdünnten Saftlösung in 8 ccm Wasser hinzu und liess das Gemisch (P_H 8) bei $37^\circ C$ 30 Min. lang stehen.

Bei der Säure-Cystein-Aktivierung (b) wurden 2 ccm Pankreassaft mit 2 ccm 0,1 Mol-Cysteinlösung oder 4 ccm behandelter Saftlösung mit 0,032 g Cystein erst bei P_H 5,5 und $37^\circ C$ 1 Stunde lang stehen gelassen, dann unter Einstellung bei P_H 5,5 mit HCl und Wasser auf 20 ccm gebracht und weiter bei $37^\circ C$ 23 Stunden lang aufbewahrt.

In den Darmsaftversuchen (c) bestand der Enzymsatz entweder aus 1 ccm Pankreassaft, 0,5 ccm Darmsaft und 8,5 ccm Wasser oder aus 2 ccm behandelter Saftlösung, 0,5 ccm Darmsaft und 7,5 ccm Wasser; man liess ihn bei P_H 6 und $37^\circ C$ 30 Min. lang stehen.

Für die Leber-Katheptase-Wirkung (d und e) wurden entweder 1 ccm Pankreassaft in 1 ccm Wasser oder 2 ccm behandelter Pankreassaftlösung mit 8 ccm mit Cystein aktivierter Katheptase-lösung bei P_H 4,5, 5 oder 5,5 bei $37^\circ C$ 30 bzw. 60 Min. lang aufbewahrt. Der Ansatz für die Aktivierung der Leber-Katheptase bestand aus 0,4 g ereptasefreiem Leber-Katheptase-Pulver oder Leber-Kathopeptonase-Pulver (erepsin- und kathepsinfrei, Sakai 1943) in 4 ccm Wasser und 4 ccm 0,1 Mol-Cysteinlösung (P_H 6, $37^\circ C$, 30 Min.).

Versuchsansatz: 3 ccm behandelte Pankreassaftlösung + 20 ccm 20%ige Kasein-Pufferlösung, mit Puffer auf 25 ccm gebracht und bei P_H 8 unter Toluol digeriert.

Allgemeine Kontrolle mit Saftlösung-Puffer ohne Kasein. Die korrigierten Werte finden sich in der Tabelle.

Pankreassaft	Digestionszeit (Stdn.)	Aciditätszunahme in 5 cem Kasein-Digestat bei PH 8 (cem 1,0 n-NaOH)									
		Aktivierung und PH-Werte									
		Pankreassaft ohne Aktivierung	a) Mit Kinasepulver PH 8 37° C, 30 Min.	b) Mit Säure-Cystein PH 5,5 37° C, 24 st	c) Mit Darmsaft PH 6 37° C, 30 Min.	d) Mit Kathetase- Cystein 37° C, 30 Min.			e) Mit Kathopeptonase- Cystein 37° C, 60 Min.		
						PH 4,5	PH 5	PH 5,5	PH 4,5	PH 5	PH 5,5
Ohne Behandlung	5	0	6,94	0,71	0,96	0,52	0,21	0,05	0,04	0	0
	24	0,08	1,1	0,93	1,19	0,75	0,55	0,33	0,16	0,13	0,11
	72	0,28	1,15	1,06	1,38	1,01	0,82	0,63	0,43	0,3	0,29
Säure- Behandlung bei PH 4, 37° C, 2 Stdn.	5	0	0,43	0	0	0	—	—	—	—	—
	24	0	0,53	0	0,07	0	—	—	—	—	—
	72	0,05	0,63	0	0,29	0,08	—	—	—	—	—
Alkali- Behandlung bei PH 2, 37° C, 24 Stdn.	5	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—
	24	0	0	0	0,06	0	—	—	—	—	—
	72	0	0,05	0	0,19	0,03	—	—	—	—	—

TABELLE VI.

*Proteolytische Wirkung der Gewebepulver-Präparate
des Schweines.*

Zur Bereitung des Gewebepulvers bewahrte man gut zerriebenen Gewebebrei mit der 4fachen Volummenge Äthylalkohol (oder Methanol) 24 Stunden lang auf und entwässerte den Niederschlag weiter 3mal mit Aceton und behandelte ihn dann mit Äther, um das Gewebe schnell zu trocknen. Hierauf wurde das Gewebepulver, das als Aktivator in Frage kommt, auf seine proteolytische Wirkung hin geprüft, indem 0,05–0,1 g Gewebepulver mit 20 ccm 1%iger Substrat- oder 0,05 Mol-Peptid-Pufferlösung unter Einstellung bei PH 7,5 mit Puffer auf 25 ccm gebracht und der Digestion bei 37°C unterworfen wurde.

Allgemeine Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne Substrat. Die korrigierten Werte zeigt die Tabelle.

Substrate	Zeit (Std.n.)	Aciditätszunahme in 5 ccm Digestat bei PH 7,5 (ccm 0,1 n-NaOH)					
		Organpräparate					
		Dünndarmschleimhautpulver		Leberpulver		Nierenpulver	
		0,05 g	0,1 g	0,05 g	0,1 g	0,05 g	0,1 g
Kasein (Hammarsten) (0,8%)	5	0,01	0	—	—	—	—
	24	0,02	0,03	—	—	—	—
	75	0,04	0,09	—	—	—	—
Witte-Pepton (0,8%)	5	—	0	0	0	0	0,01
	24	—	0,02	0	0	0,01	0,01
	72	—	0,15	0	0,02	0,05	0,28
Pepton K (0,8%)	5	—	0	—	0,02	—	0,05
	24	—	0,01	—	0,03	—	0,06
	72	—	0,06	—	0,05	—	0,21
Diglycin (1/25 Mol)	5	0	0,01	—	0,16	—	0,28
	24	0,01	0,01	—	0,85	—	1,02
	72	0,01	0,03	—	1,39	—	1,74

VERSUCH ZUM OZONABBAU DES LEPROTINS.

VON

YOSHIHARU TAKEDA UND TATUO OHTA.

(Aus dem Bakteriologischen Institut der Kaiserlichen Universität
Taihoku, Taiwan, Nippon.)

Zur weiteren Kenntnis über die Konstitutionsermittlung des Leprotins haben wir den Ozonabbau des Leprotins zu erforschen versucht, indem wir in den letzten zwei Jahren 200 mg Kristall durch Wiederholung des Versuches der Auskristallisierung¹⁾ des Farbstoffes vom chromogenen *Mycobacterium* gesammelt haben.

Beim Abbau des Leprotins mit Ozon erhielten wir weder Geronsäure noch Isogeronsäure; daraus schliessen wir, dass der 1,1,3-Trimethyl-cyclohexan-Ring mit gleicher Lage der Doppelbindung wie im α - und β -Jonen, also im Leprotin nicht vorkommt.

Mit diesem Ergebnis steht das biologische Verhalten des Leprotins im Einklang; denn wie wir²⁾ schon berichtet haben, erwies sich im Versuch eine Provitamin-A Wirkung des Leprotins negativ, woraus hervorgeht, dass der β -Jononring in diesem Carotinoid nicht eingeschlossen ist.

Bei der Bestimmung der Isopropylidengruppen nach der Methode von Kuhn und Roth³⁾ über Leprotin wurde kein Aceton nachgewiesen; so dass man daraus schliessen kann, dass die Ringöffnung wie bei Lycopin in Leprotin nicht vorkommt.

Über die optische Aktivität des Leprotins lässt sich nichts Sicheres sagen, wenn auch keine optische Drehung im Bereiche einer möglichen Ablesung beobachtet wurde.

Wie die Elementaranalyse zeigt,³⁾ ist Leprotin ein Kohlenwasserstoff, in dessen Molekül α - oder β -Jononring und die lycopinartige Ringöffnung durch oben ausgeführte Versuche vernichtet liessen; somit ist es nicht mehr wahrscheinlich, dass Leprotin gleich

1) Y. Takeda und T. Ohta, Ztschr. physiol. Chem. **258**, 6 (1939).

2) Y. Takeda und T. Ohta, Ztschr. physiol. Chem. **267**, 171 (1941).

3) Ber. chem. Ges., **65**, 1285 (1932).

Dehydro- β -Carotin¹⁾ ist und es gibt auch keinen Beweis, der leicht zur Formierung einer Hälfte oder einer Endgruppe des Leprotinmoleküls führen könnte.

Wir sind jetzt dabei eine grosse Menge Material anzusammeln, um den Oxydationsabbau auszuführen. Sollten die charakteristischen Spaltstücke sich aus diesem Carotinoid herauschlagen lassen, welche wertvolle Hinweise für die Aufstellung der Strukturformel bieten, so werden wir in der nächsten Mitteilung einige Schlüsse über die Konstitutionsermittlung des Leprotins ziehen können.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Mikro-Polarisation.*) 2,5 mg Subst. werden in 3 ccm Benzol gelöst und C-Linie (6563) aus einem Monochromator durchgelassen.

$l=1$ dm. lässt keine Drehung erkennen. Die Färbung der Lösung bereitete beim Ablesen Schwierigkeiten.

Isopropylidengruppen. 5,73 mg Subst. verbrauchten 0,06 ccm $n/20$ Jodlösung. Gef. 0,36% C_3H_6 . Berechnet für eine Isopropylidengruppe ($C_{40}H_{54}$): 7,85% C_3H_6 .

Ozonabbau des Leprotins. 133 mg Leprotin wurden in 4,0 ccm Tetrachlorkohlenstoff suspendiert und 4,5 Stunden ozonisiert. Dabei war der Hauptteil des Farbstoffes farblos geworden. Darauf wurde es mit 4,0 ccm Eisessig versetzt und weiter 6 Stunden ozonisiert, durch Versetzen mit 15 ccm Wasser 1 Stunde am Rückfluss gekocht und dann im Vakuum zu Sirupdicke konzentriert. Die letzten Essigsäurereste wurden mit 10 ccm Wasser versetzt und neuerlich im Vakuum eingengt und verjagt. Nun schüttelt man den öligen Rückstand 5 mal mit 20 ccm Äther, entzieht dem letzteren die sauren Bestandteile durch fünfmalige Extraktion mit je 3 ccm konzentrierter Natriumbicarbonatlösung, säuert die wässrige Flüssigkeit mit Phosphorsäure an und zieht insgesamt 150 ccm Äther portionsweise aus. Der Abdampfrück-

*) Herrn Dr. S. Kuwada und A. Watanabe, wissenschaftliches Laboratorium der Firma Ch. Takeda & Co. Ltd., Osaka, danken wir an dieser Stelle besonders für die Durchführung dieser Bestimmung.

stand des Äthers ergab dabei eine hellgelbe, ölige Masse, die mit 0,8 ccm heissem Wasser extrahiert, deren Lösung filtriert und mit einer solchen von 65 mg Semicarbazid-chlorhydrat und 130 mg Natriumacetat in 0,3 ccm Wasser versetzt wurde. Von dieser Lösung schied nach 55 stündigem Stehenlassen im Eisschrank kein Krystall aus.

Unter gleichen Bedingungen wurde der Abbauersuch mit 66 mg reinem β -Carotin durchgeführt und in gleicher Weise nachbehandelt, wobei 5 mg Rohkrystall des Geronensäure-Semicarbazons gewonnen wurde.

Der Japanischen Gesellschaft zur Förderung der Naturwissenschaften (Nippon-Gakuzyutu-Sinkokwai) sind wir für ihre Unterstützung zu bestem Dank verpflichtet.



ÜBER DAS VERHALTEN VERSCHIEDENER KOHLEHYDRATE DER ORGANE UND GEWEBE IM HUNGERZUSTAND UND WÄHREND DES WINTERSCHLAFS.

VON

I. IUTL.

(Aus dem Biochemischen Institut des Präfekturkrankenhauses zu Kobe.
Vorstand: Dr. M. Takeda.)

Es liegt eine grosse Anzahl von Arbeiten über die Einflüsse des Hungers auf den Glykogengehalt der Leber (Cori u. Cori, Barbour, Fischer u. Lacey, Junkersdorf, Dann u. Chambers) und anderer Organe (Lawrence u. McCance, Junkersdorf u. Mischnat, Junkersdorf u. Hanisch, Okugawa) vor. Andere Autoren haben sich mit dem Schicksal des Glykogens der Leber und anderer Organe in normalen sowie verschiedenen pathologischen Ernährungszuständen beschäftigt (Takao, Hynd u. Rotter, Dittmar). Imamura hat durch seine umfangreichen Untersuchungen bei Kröten das Verhalten des Glykogengehaltes und Gesamtstoffwechsels im Ablauf des Winterschlafs weitgehend geklärt. Wie sich andere Kohlehydrate als Glykogen im Hungerzustand und während des Winterschlafs verhalten, darüber gibt es bis heute nur wenige Mitteilungen. Dann u. Chambers haben bei Hungerhunden ausser dem Glykogengehalt der Leber und der Skelettmuskeln auch das Verhalten des freien Zuckers in denselben verfolgt. Yamamoto hat festgestellt, dass in den tierischen Organen und Geweben neben dem Glykogen noch zwei Zuckerarten, d.h. freier sowie hydrolysierbarer Zucker, vorhanden sind, und heute kann man mittels der von ihm ausgearbeiteten Methode diese Zuckerarten sowie das Gesamtkohlenhydrat quantitativ bestimmen. Ich bin an Hand dieser Methode durch die in verschiedenen Zeitpunkten des Hungers und Winterschlafs durchgeführten, systematischen Organ- und Gewebsanalysen dem Verhalten des Gesamtkohlenhydrats und der genannten Zuckerarten nachgegangen.

Methodik.

Im Hungerversuch wurden Ratten von gleichem Alter (Durchschnittsgewicht 130 g) und Kröten (Durchschnittsgewicht 200 g) gebraucht. Die ersteren waren bis zum Beginn des Versuchs vorwiegend mit nichtgeschältem Reis und die letzteren mit Insekten gefüttert. Im eigentlichen Versuch werden die Tiere zum Experiment einzeln in einen eisernen Käfig gebracht und es wird ihnen nur Wasser gegeben. Es wird an Leber, Herzen, Niere, Skelettmuskel und Haut die Gewebszuckerbestimmung nach der Yamamoschen Methode vorgenommen. Zu diesem Zwecke wird ungefähr 1 g Organ- bzw. Gewebstück gebraucht. Im Winterschlafversuch werden Kröten zur Verfügung gestellt, wobei die Zuckerspiegel von Leber, Skelett-Muskeln und Haut in verschiedenen Stadien des Winterschlafs analysiert und weiter mit denen in der Periode des Erwachens verglichen werden.

Versuchsergebnisse.

1. Die Zuckerspiegel der Organe und Gewebe bei Hungerratten.

Die Zuckerbilder (Gesamtkohlehydrat, freien sowie hydrolysierbarer Zucker und Glykogen) von Leber, Niere, Herzen, Skelettmuskeln und Haut der gesunden Ratten weisen keine nennenswerten individuellen Schwankungen auf. Tabelle I gibt die Durchschnittswerte von 5 Fällen wieder.

TABELLE I.

Zuckerbilder von Leber, Skelettmuskeln, Haut, Herzen und Niere
der normalen Ratten.

(Durchschnitt von 5 Ratten).

	Gesamtkohle- hydrat mg%	Freier Zucker mg%	Hydrolys. Zucker mg%	Glykogen mg%
Leber	4420	1145	486	2769
Skelettmuskel	733	266	241	226
Haut	552	224	212	116
Herz	452	167	210	75
Niere	951	406	440	105

Die Resultate der Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten des Hungers sind aus Tabelle II ersichtlich.

TABELLE II (A).

Zuckerbilder von Leber, Skelettmuskeln, Haut, Herzen und Niere
in der 12. Hungerstunde.

(Durchschnitt von 3 Ratten).

	Gesamtkohle- hydrat mg%	Freier Zucker mg%	Hydrolys. Zucker mg%	Glykogen mg%
Leber	2132	1066	452	614
Skelettmuskel	648	228	200	220
Haut	532	212	196	124
Herz	470	186	190	94
Niere	952	400	452	100

TABELLE II (B).

Zuckerbilder von Leber, Skelettmuskeln, Haut, Herzen und Niere
in der 24. Hungerstunde.

(Durchschnittswerte von 3 Ratten).

	Gesamtkohle- hydrat mg%	Freier Zucker mg%	Hydrolys. Zucker mg%	Glykogen mg%
Leber	942	442	402	98
Skelettmuskel	380	146	160	74
Haut	444	138	209	97
Herz	464	194	192	78
Niere	968	398	478	92

TABELLE II (C).

Zuckerbilder von Leber, Skelettmuskeln, Haut, Herzen und Niere
in der 48. Hungerstunde.

(Durchschnittswerte von 3 Ratten).

	Gesamtkohle- hydrat mg%	Freier Zucker mg%	Hydrolys. Zucker mg%	Glykogen mg%
Leber	940	410	430	100
Skelettmuskel	434	170	186	78
Haut	470	142	230	98
Herz	470	200	190	80
Niere	940	400	442	98

TABELLE II (D).

Zuckerbilder von Leber, Skelettmuskeln und Haut in der 72. Hungerstunde.
(Durchschnittswerte von 3 Ratten).

	Gesamtkohle- hydrat mg%	Freier Zucker mg%	Hydrolys. Zucker mg%	Glykogen mg%
Leber	888	356	422	110
Skelettmuskel	446	116	192	138
Haut	404	110	194	100

Betreffs des Verhaltens der einzelnen Zuckerarten verschiedener Organe und Gewebe während des Hungers hat sich bei Ratten folgendes ergeben:

Bei Hungerratten wird zuerst das Leberglykogen abgebaut. Nach 12 Stunden sind schon $\frac{3}{4}$ der Anfangswerte zum Schwund gebracht, nach 24 Stunden ist nur eine Spur desselben nachweisbar (Abnahme bis auf $\frac{1}{27}$ der Anfangswerte). Dieser Zustand des Glykogenminimum besteht auch in späteren Hungerperioden fort. Abgesehen von diesem auffallenden Glykogenverlust der Leber erfährt der freie Zucker in der 12. Hungerstunde nur eine geringfügige Abnahme. Dagegen zeigt in der 24. Hungerstunde ausser dem Glykogen auch der Gesamtkohlehydratgehalt der Skelettmuskeln und der Haut die Minimalwerte während des ganzen weiteren Verlaufs des Hungers auf. Auch nimmt der freie Zucker der Leber in beträchtlichem Masse ab ($\frac{1}{3}$ der Anfangswerte). Es wird auch eine ziemlich deutliche Verminderung des freien Zuckers der Skelettmuskeln und der Haut bemerkt (bei den ersteren 45%ige und bei der letzteren 38%ige Abnahme). Sonst lassen sich Glykogenabnahme an den Skelettmuskeln (57%), Verminderung des hydrolysierbaren Zuckers (34%), des Glykogens (36%) an der Haut sowie die des hydrolysierbaren Zuckers der Leber (17%) nachweisen.

Nach 48 Hungerstunden zeigt die Gesamtkohlenhydratmenge der Leber zwar denselben Wert wie beim 24 Stunden-Hunger, sie nimmt aber an der Haut und den Skelettmuskeln mehr zu. Was die Werte der einzelnen Zuckerarten betrifft, so zeigt sich nur noch

weitere Abnahme des freien Zuckers der Leber, während der freie Zucker der Skelettmuskeln und der hydrolysierbare Zucker der Leber, der Skelettmuskeln und der Haut, nachdem die beiden in der 12. Hungerstunde einmal bis auf die Minimalwerte abgesunken sind, wenn auch nur leichtgradig, doch eine Zunahme erfahren. In weiterem Verlauf (in der 72. Hungerstunde) des Hungers wird der freie Zucker in Leber, Skelettmuskeln und Haut vermindert, dagegen werden die Glykogenwerte derselben mehr erhöht. Es ist interessant, dass an Herzen und Niere sowohl das Gesamtkohlenhydrat wie auch die einzelnen Zuckerarten durch den ganzen Verlauf des Hungers hindurch die Anfangswerte beibehalten. Dasselbe kann auch betreffs des Verhaltens des hydrolysierbaren Zuckers der Haut gesagt werden. Kurz zusammengefasst spielt sich bei Hungerratten zuerst und rasch der Abbau des Leberglykogens ab und es wird nach 12 Hungerstunden zum grössten Teil zum Schwund gebracht. In weiteren 12 Stunden kommt es zum Abbau des freien Zuckers in Leber, Skelettmuskeln und Haut, und weiter des Glykogens wie des hydrolysierbaren Zuckers in den Skelettmuskeln, und dazu noch des Hautglykogens. Durch diese Prozesse wird ein bestimmter Betrag der Glucose von den genannten Geweben bzw. Organen ins Blut abgegeben. Nachdem Leber, Skelettmuskeln und Haut in der 24. Hungerstunde einmal in den Zustand des Gesamtkohlenhydratminimums versetzt sind, kommt es in weiteren Hungerstunden vielmehr zur Zunahme des Gesamtkohlenhydrates. Was das Verhalten der einzelnen Zuckerarten betrifft, so lässt sich in der 48. Hungerstunde Wiederanstieg des hydrolysierbaren Zuckers in Leber, Skelettmuskeln und Haut, und in der letzten Hungerperiode Erhöhung der Glykogenmenge der Leber beobachten. Man könnte vermuten, dass diese in späteren Hungerperioden stattfindende Zunahme des hydrolysierbaren Zuckers sowie Glykogens durch Zuckerbildung aus Eiweiss- und Fettsubstanzen im Ablauf des intermediären Stoffwechsels bedingt wäre.

2. Veränderungen der Zuckerwerte der Organe und Gewebe im Hungerzustand bei Kröten in der Periode des Erwachens.

Die Ergebnisse sind in Tabelle IV. zusammengestellt.

TABELLE III.

Zuckerbilder von Leber, Skelettmuskeln und Haut bei normalen Kroeten
in der Periode des Erwachsens.
(Durchschnitt von 5 Fällen).

	Gesamtkohle- hydrat mg%	Freier Zucker mg%	Hydrolys. Zucker mg%	Glykogen mg%
Leber	10210	3280	3716	3214
Skelettmuskel	1166	211	405	550
Haut	666	263	305	98

TABELLE IV (A).

Zuckerbilder von Leber, Skelettmuskeln und Haut bei hungernden
Kroeten in der Periode des Erwachsens.
(5 Tage Hunger).

	Gesamtkohle- hydrat mg%	Freier Zucker mg%	Hydrolys. Zucker mg%	Glykogen mg%
Leber	8640	440	600	7600
Skelettmuskel	1262	322	256	684
Haut	880	270	430	180

TABELLE IV (B).

Zuckerbilder von Leber, Skelettmuskeln und Haut bei hungernden Kröten
in der Periode des Erwachsens.
(12 Tage Hunger) (Durchschnitt von 3 Fällen).

	Gesamtkohle- hydrat mg%	Freier Zucker mg%	Hydrolys. Zucker mg%	Glykogen mg%
Leber	8800	389	520	7900
Skelettmuskel	960	220	240	500
Haut	470	124	256	90

TABELLE IV (C).

Zuckerbilder von Leber, Skelettmuskeln und Haut bei hungernden
Kroeten in der Periode des Erwachsens.
(25 Tage Hunger) (Durchschnitt von 3 Fällen).

	Gesamtkohle- hydrat mg%	Freier Zucker mg%	Hydrolys. Zucker mg%	Glykogen mg%
Leber	8980	60	380	8540
Skelettmuskel	1010	86	164	760
Haut	456	76	275	105

Bei Kröten lässt sich schon im beginnenden Stadium (ersten 5. Hungertage) ein rasches Absinken der Werte des freien sowie hydrolysierbaren Zuckers der Leber bemerken. Dagegen erfährt das Leberglykogen zu dieser Zeit eine beträchtliche Zunahme. Betreffs der Zuckerwerte der Skelettmuskeln und der Haut zeigt sich nur ein geringfügiger Anstieg des Glykogens derselben. Im weiteren Verlauf (bis zum 12. Hungertage) werden keine Änderungen der Mengenverhältnisse des hydrolysierbaren Zuckers sowie Glykogens in der Leber wahrgenommen, der freie Zucker in diesem Organ nimmt aber ab. In der letzten Hungerperiode (nach 25 Hungertagen) erfolgt noch weitere Abnahme des freien Zuckers in Leber, Skelettmuskeln und Haut. Ebenso wird eine leichtgradige Verminderung auch des hydrolysierbaren Zuckers in denselben gesehen, während der Glykogengehalt beinahe auf demselben Niveau stehen bleibt, wie im vorangehenden Stadium.

3. Zuckerspiegel der tierischen Organe und Gewebe während des Winterschlafs.

Schon seit langem haben die Forscher ihre Aufmerksamkeit auf die interessante Tatsache gelenkt, dass bei Winterschläfern trotzdem keine Nahrungsaufnahme stattfand in Leber und Skelettmuskeln eine beträchtliche Menge Glykogens aufgestapelt ist. Im Zusammenhang damit ist es leicht zu erwarten, dass der freie sowie hydrolysierbare Zucker während dieser Periode sich anders verhalten müssten wie in sonstigen Jahreszeiten. Darüber besitzen wir jedoch keine genauen Angaben.

Wirft man einen Blick auf die analytischen Daten der verschiedenen Zuckerarten in verschiedenen Winterschlafperioden und vergleicht man sie mit denen in der normalen Periode, so fällt zuerst ins Auge, dass der Gehalt der Leber an freiem wie hydrolysierbarem Zucker bei winterschlafhaltenden Kröten in bedeutendem Ausmasse vermindert, dagegen der Glykogengehalt in demselben Organ deutlich erhöht ist.

Diese Veränderungen der Zuckerbilder an der Krötenleber während des Winterschlafs lassen sich schon im Anfangsstadium feststellen, besonders ausgesprochen sind sie aber zur Zeit des tieferen Winterschlafs. Neben dieser merkwürdigen Erscheinung

TABELLE V.

Zuckerbilder von Leber, Skelettmuskeln und Haut
Bei Winterschlaf haltenden Kröten.

(Durchschnittswerte).

Datum	Versuchsorgan od. Gewebe	Gesamt- kohle- hydrat mg%	Freier Zucker mg%	Hydrolys. Zucker mg%	Glykogen mg%
20/X	Leber	11420	520	480	10420
	Skelettmuskel	1400	200	200	1000
	Haut	600	228	272	100
20/XI	Leber	18812	100	108	18604
	Skelettmuskel	1480	148	162	1170
	Haut	342	120	122	100
10/XII	Leber	12600	150	150	12300
	Skelettmuskel	1400	120	120	1160
	Haut	446	166	170	110
26/I	Leber	13980	580	500	12900
	Skelettmuskel	1200	112	138	950
	Haut	600	268	222	110
23/II	Leber	14840	680	760	13400
	Skelettmuskel	1410	114	126	1170
	Haut	800	380	320	100
3/IV	Leber	12100	600	500	11000
	Skelettmuskel	940	190	126	614
	Haut	684	278	296	110
28/V	Leber	4849	541	502	3806
	Skelettmuskel	670	226	202	242
	Haut	480	100	294	86
16/VI	Leber	2100	220	548	1332
	Skelettmuskel	588	208	238	142
	Haut	490	156	228	106

ist aber als weiterer augenfälliger Befund Zunahme des Glykogengehalts der Skelettmuskeln und anderseits Abnahme des hydrolysierbaren sowie freien Zuckers in Skelettmuskeln und Haut zu nennen. Diese Verminderungen der letzteren beiden Zuckerarten in Leber, Skelettmuskeln und Haut kommen umso deutlicher zum Vorschein, je tiefer der Winterschlaf wird. Sie erreichen im November und Dezember die Minimalhöhe. Ende Januar aber beginnt der freie und hydrolysierbare Zucker der Leber wieder zuzunehmen. Zu gleicher Zeit tritt eine deutliche Erhöhung der Menge des freien wie hydrolysierbaren Zuckers der Haut auf.

Schon Ende Februar kehren diese zu den Werten in der Periode des Nichtwinterschlafs zurück. In den Skelettmuskeln zeigen sie aber keine Vermehrung auf, sondern dieselben minimalen Werte wie im Dezember. Erst Ende April kommt es zur Steigerung der Menge des freien Zuckers in den Skelettmuskeln bis nahe an die Werte in der Periode des Nichtwinterschlafs, wobei jedoch keine Zunahme des hydrolysierbaren Zuckers stattfindet. Dieser bleibt noch immer in der Höhe von ein $\frac{1}{3}$ der Werte in der Periode des Nichtwinterschlafs. Die Glykogenwerte der Leber und der Skelettmuskeln erreichen im November ihr Maximum, und sie zeigen bis zum Februar nur leichtgradige Abnahme. Anfang April, d.h. nach der Legezeit, wird aber diese Verminderung ziemlich deutlich, besonders in den Skelettmuskeln. Hier zeigt sich ein Absinken bis auf die Hälfte der Maximalwerte. Weiter wird das Absinken der Glykogenwerte in Leber und Skelettmuskeln Ende Mai, wo Kröten zu erwachen beginnen, um so ausgeprägter. Aus der Vergleichstellung der Zuckerspiegel von Leber, Skelettmuskeln und Haut zwischen den Kröten im Winterschlaf einer- und den Hungerkröten in der Periode des Nichtwinterschlafs anderseits stellt sich heraus, dass die Abnahme des freien Zuckers in Leber, Skelettmuskeln und Haut in beiden Fällen fast in gleicher Stärke geschieht, während die Verminderung des hydrolysierbaren Zuckers bei den Kröten im Winterschlaf in stärkerem Grade vor sich geht und ferner der Glykogengehalt der Leber und der Skelettmuskeln zwischen beiden Fällen weitgehende Abweichungen aufweist. Nämlich der Glykogengehalt der Leber erfährt bei beiden Fällen im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Zunahme, wobei sie aber bei den winterschlafhaltenden Kröten in weit bedeutenderem Masse stattfindet wie bei den Hungerkröten. Was den Glykogengehalt der Skelettmuskeln betrifft, so zeigt er bei Hungerkröten nur eine geringe Zunahme, während er bei winterschlafhaltenden Kröten ungefähr um das Doppelte vermehrt ist wie bei der Kontrolle.

Kurz gesagt findet bei Winterschläfern im Ablauf des Winterschlafs kein Verlust des Organ- bzw. Gewebeglykogens statt, sondern es zeigt in Leber, Skelettmuskeln und Haut die Maximalwerte, indem auf Kosten des freien und hydrolysierbaren Zuckers die

Umbildung in Glykogen erfolgt, was das Absinken der ersteren bis auf das Minimum zur Folge hat. Aber bei Hungerkröten findet der Verlust des Gesamtkohlenhydrats der Organe bzw. Gewebe statt; hier geschieht die Umwandlung der ganzen Menge des freien Zuckers und des grössten Teils des hydrolysierbaren Zuckers in Glykogen. So sind die Unterschiede zwischen den Hungerkröten und winterschlafhaltenden Kröten insofern, als es sich auf das Verhalten des Kohlenhydratstoffwechsels bezieht, darin zu erkennen, ob der Kohlenhydratverlust im Verlauf des Versuchs auftritt oder nicht, und weiter, ob von dem hydrolysierbaren Zucker der Leber und Haut die ganze Menge oder der grösste Teil in Glykogen umgebildet werden.

Wenn man nun die Verschiebungen der Zuckerbilder der Organe bzw. Gewebe bei Hungerratten einer- und Hungerkröten anderseits in Vergleich stellt, so ist als markanter Unterschied hervorzuheben, dass bei den ersteren das Leberglykogen schon im beginnenden Stadien abnimmt, dagegen bei den letzteren eine beträchtliche Zunahme erfährt. Auch ist das Verhalten des hydrolysierbaren Zuckers bei Hungertieren bemerkenswert, d.h. die Werte dieser Zuckerart in der Leber zeigen bei Ratten trotz des Fortschreitens der Hungerstadien nur sehr geringe Abweichungen, während bei Kröten schon in beginnenden Stadien erhebliche Senkung auftritt.

Anderseits hat nun Okugawa festgestellt, dass sich bei Hungertauben der hydrolysierbare Zucker der Leber und der Skelettmuskeln im wesentlichen nicht anders verhält als bei der Kontrolle, was von Yamamoto auch im Kaninchenversuch bestätigt wurde. So wäre dem hydrolysierbaren Zucker in der Leber der Hungerkröten, wie oben auseinandergesetzt, vom biologischen Gesichtspunkt eine Sonderstellung einzuräumen. Wenn dem so ist, wodurch ist diese eigenartige Erscheinung bedingt? Die Frage dreht sich darum, ob der hydrolysierbare Zucker der Krötenleber eine andere chemische Zusammensetzung hatte oder ob die genannten Verschiedenheiten bloss funktionelle sind. Bezüglich dieser Frage ist meine Untersuchung noch im Gang.

Zusammenfassung.

1. Um dem Verhalten des Gesamtkohlenhydrats und der einzelnen Zuckerkomponente der tierischen Organe und Gewebe im Hungerzustande und im Verlauf des Winterschlafs näherzukommen, wurde bei Ratten und Kröten die zeitmässige Analyse der Zuckerspiegel verschiedener Organe und Gewebe vorgenommen.

2. Bei Hungerratten tritt die Glykogenabnahme der Leber zuerst und schon in früheren Stadien (in 12 Stunden) sehr rasch und in sehr bedeutendem Masse auf. Sie erreicht nach 24. Hungerstunden das Minimum, um in den folgenden Stadien fast keine Schwankungen mehr aufzuweisen. Betreffs anderer Kohlenhydratarten in Leber, Skelettmuskeln und Haut geht ihre Abnahme relativ langsam vor sich, im Zeitraum zwischen der 12. und 24. Hungerstunde geschieht sie aber in raschem Tempo und in sehr starkem Grade. In der 24. Hungerstunde kommt es zum Zustand des Kohlenhydratminimums während des ganzen Hungerverlaufs. Im weiteren Verlauf zeigt sich stetiges und langsames Absinken der Werte des freien Zuckers in der Leber, und nach 48 Hungerstunden weisen sowohl der hydrolysierbare in Leber, Skelettmuskeln und Haut, wie auch der freie Zucker in Skelettmuskeln und Haut, wenn auch geringgradig, doch eine Zunahme auf. Schliesslich tritt das letzte Hungerstadium ein, in dem leichtgradiger Verlust des freien Zuckers in Leber, Skelettmuskeln und Haut, weiter noch geringfügige Glykogenzunahme in Leber, Skelettmuskeln und Haut beobachtet wird. Aus diesen Ergebnissen liesse sich schliessen, dass die Glukoseabgabe vom Organ bzw. Gewebe aus ins Blut in solcher Reihenfolge geschieht, dass bis zur 12. Hungerstunde das Leberglykogen, im Ablauf von 12–24 Hungerstunden alle Zuckerarten bes. das Glykogen und der freie Zucker in Leber, Skelettmuskeln und Haut und von der 24. Hungerstunde ab durch die Transformation von Eiweiss-sowie Fettsubstanzen gebildetes Glykogen und hydrolysierbarer Zucker die Quelle der Blutglucose darstellen. An Herzen und Niere lassen sich durch die ganzen Hungerperioden hindurch keine Abweichungen der Gesamt- und Einzelzuckerwerte erkennen. Dasselbe kann auch betreffs des

Verhaltens des hydrolysierbaren Zuckers der Haut gesagt werden.

3. Im Gegensatz zu den Hungerratten tritt bei Hungerkröten schon im beginnenden Stadien rasche Abnahme des freien sowie hydrolysierbaren Leberzuckers auf, dagegen nimmt der Glykogengehalt der Leber zu. In der letzten Hungerperiode ist der freie Zucker in der Leber immer noch stärkerem Abbau unterworfen, und die Abnahme desselben in Skelettmuskeln und Haut ist auch ausgesprochen. Im Gegensatz dazu nimmt das Leberglykogen immer mehr zu. Aber die Vermehrung des Glykogens in Skelettmuskeln und Haut und die Verminderung des hydrolysierbaren Zuckers in Leber sowie Haut treten bezüglich ihres Grades gegenüber den winterschlafhaltenden Kröten weit zurück.

4. Bei Kröten lassen sich schon im Anfangsstadium des Winterschlafs einerseits deutliche Verminderung des freien sowie hydrolysierbaren Zuckers in der Leber, anderseits erhebliche Zunahme des Leberglykogens erkennen. Diese bemerkenswerte Erscheinung betreffs der Zuckerspiegel seitens der Leber zeichnet sich umso schärfer ab, je tiefer der Winterschlaf wird, und im Ablauf von November und Dezember erreicht das Absinken der Menge des freien sowie hydrolysierbaren Zuckers nicht nur in Leber, sondern auch in Skelettmuskeln und Haut einerseits, die Glykogenvermehrung in Leber und Skelettmuskeln anderseits den Höhepunkt. Vom Januar ab beginnt der freie, ebenso hydrolysierbare Zucker in Leber und Haut zuzunehmen, ihre Zunahme in den Skelettmuskeln tritt aber erst im April ein. Das Leber wie auch Hautglykogen weist nach dem Januar geringe Abnahme auf, bis es vom April ab eine beträchtliche Verminderung erfährt.

5. Die Unterschiede betreffs des Verhaltens des Kohlenhydratstoffwechsels bei Kröten während des Winterschlafs und bei Hungerkröten in der Periode des Nichtwinterschlafs besteht darin, dass der Kohlenhydratverlust in Organen und Geweben ausschliesslich bei den letzteren beobachtet, dagegen bei den ersteren ganz vermisst wird, und weiter, dass die Umbildung des hydrolysierbaren Zuckers in Leber und Haut in Glykogen bei den ersteren in toto, dagegen bei den letzteren bis auf einen kleinen Rest erfolgt.

6. Bei Kaninchen, Ratten und Tauben wird auch in der

letzten Periode des Hungers im wesentlichen keine Abnahme des hydrolysierbaren Zuckers in der Leber und den Skelettmuskeln beobachtet, was im Vergleich zu den Hungerkröten grundsätzlich verschieden ist, bei welchen schon im Anfangsstadium des Hungers eine beträchtliche Abnahme desselben Zuckers der Leber zum Vorschein kommt. Wodurch diese biologische Besonderheit, die der hydrolysierbare Zucker der Krötenleber gegenüber der Warmblüterleber aufweist, bedingt ist, ob es mit verschiedenen chemischen Zusammensetzungen oder einfach mit der funktionellen Verschiedenheit, darüber ist meine Untersuchung noch im Gang.

LITERATUR.

- Cori u. Cori (1928): J. Biol. Chem., **79**, 309.
Cori u. Cori (1929): Bioch. Z., **206**, 40.
Barbour, Chaikoff u. Macleod (1927): Am. J. Physiol., **80**, 243.
Fisher u. Lackey (1925): Am. J. Physiol., **72**, 43.
Junkersdorf (1921): Pflügers Arch., **186**, 238.
Junkersdorf (1925): Pflügers Arch., **210**, 351.
Dann u. Chambers (1932): J. Biol. Chem., **95**, 413.
Lawrence u. McCance (1931): Biochem. J., **25**, 570.
Junkersdorf u. Mischnat (1930): Pflügers Arch., **224**, 151.
Junkersdorf u. Hanisch (1927): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **123**, 231.
Okugawa (1943): Jikken Shokakibyogaku, **17**, 7.
Takao (1926): Bioch. Z., **172**, 272.
Hynd u. Rotter (1930): Biochem. J., **24**.
Dittmar (1933): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., **171**, 496.
Imamura (1919): Tokyo Igakkwai Zasi, **33**, 24.
Yamamoto (1940): J. of Biochem., **32**, 161 u. 389.



INDEX TO VOLUME 36

A

ABISAKA, Masanobu. Über die Verteilung des Kryptoxanthins in pflanzlichen Geweben. I. 101.
II. 263.

Alkoholische Gärung. Über den Einfluss des Carnosins und Ophidins auf die ———. 283.

β -Alloisoxycholsäure. Über die Synthese der ——— auf Cholsäure. 183.

Aminosäure. Über die im Tierkörper stattfindenden Veränderungen der an N substituierten —n. 349, 355.

Absorption. Biochemical studies on *d*-ribose with special reference to the mechanism of — of sugars from intestinal tract. 131.

ARA, Kiyoshi. Über die Verwertung der Fettsäuren in der Leber und dem Muskel beim Hungern. 1.

Arginase. Über die Spezifität der —. 243.

B

Bisnorsterocholan. Über die Synthese von Homocholan $C_{27}H_{44}$ und — $C_{26}H_{40}$ und Isohomocholan aus Tetraoxyisohomocholan aus der Galle von Wassersalamandern. 77.

C

Carbohydrate. Biochemical studies on —s. 395, 399.

Carnosin. Über den Einfluss des —s und Ophidins auf die alkoholische Gärung. 283.

Chenodesoxycholsäure. Über den Bildungsmechanismus der — im Organismus. 55, 61, 163.

Cholsäure. Über die Synthese der β -Alloisoxycholsäure aus —. 183.

Chondridin. On so-called —. 399.
Chondrosin. 399.

D

Demethylase. Über die —. 349, 355.

β -3- α -12-Dioxy-allocholsäure. Synthese der — und der β -3- α -12-Dioxycholsäure. 173.

β -3- α -12-Dioxy-Cholsäure. Synthese der β -3- α -12-Dioxy-Allocholsäure und der —. 173.

3.7-Dioxy-12-Ketocholsäure. Über das Schicksal der — im Kaninchenorganismus. 61.

3.7-Dioxy-12-Ketocholsäure. Über das Schicksal der — sowie der 3.7.12-Triketocholsäure im Meer-schweinchenorganismus. 163.

E

Embryo. Über den respiratorischen Stoffwechsel beim — der Reptilien. 337.

Endotoxin von *Bacillus Dysenteriae* Shiga. Studien über das — — —. 419.

Endotoxin von *Salmonella Typhi*. Studien über das — — —. 407.

F

Fermente. Über die — der Meer-schildkrötenorgane. 301.

Fettsäure. Über den Gehalt der Gewebe an verschiedenen ungesättigten —n im Fett und Phosphatid bei Normal- sowie Fettdiät. 17.

Fettsäure. Über die Verwertung der —n in der Leber und dem Muskel beim Hungern. 1.

G

Gallensäure. Über die —n von Wassersalamandern. 65, 77.

Gewebeproteolyse. Über die —. 383, 427, 443.

Glycoprotein. On neutral polysaccharides of —s. 395.

H

Harn. Chemische Untersuchungen des —s von *Chelonia japonica* Thumb. 313.

Histidin. Der enzymatische Abbau des —s. 227.

Histidin. Die Mikrobestimmungsmethode des —s in Harn. 43.

Homocholan. Über die Synthese von — $C_{25}H_{44}$ und Bishnorsterocholan $_{26}H_{46}$ und Isomocholan aus Tetraoxyisomocholan aus der Galle von Wassersalamandern. 77.

Hunger. Über die Verwertung der Fettsäuren in der Leber und dem Muskel beim —n. 1.

I

IMAMURA, Hiroyuki u. Shun WAKESHIMA. Über das Auftreten der Milchsäure im Harn nach dem Kardiazolkrampf. 335.

Isomocholan. Über die Synthese von Homocholan $C_{25}H_{44}$ und Bishnorsterocholan $C_{26}H_{46}$ und — aus Tetraoxyisomocholan aus der Galle von Wassersalamandern. 77.

IUTI, I. Über das Verhalten verschiedener Kohlehydrate der Organe und Gewebe im Hungerzustand

und während des Winterschlafs. 539.

IWAKAWA, Yosinobu. Studies on the Pasteur reaction in muscle. 191.

K

KANEMITU, Tutomu u. Kanzi IMAI. Über den Bildungsmechanismus der Chenodesoxycholsäure im Organismus. VI. Über das Schicksal der 3.7-Dioxy-12-Ketocholansäure sowie der 3.7.12-Triketocholansäure im Meerschweinchenorganismus. 163.

KATAOKA, Yoshimi. Über den Bildungsmechanismus der Chenodesoxycholansäure im Organismus. IV. Über das Schicksal der 3-Oxy- Δ^7 -Cholensäure im Kaninchen- und Meerschweinchenorganismus. 55. V. Über das Schicksal der 3.7-Dioxy-12-Ketocholansäure im Kaninchenorganismus. 61.

KAWAHARADA, Masamiti. Über die Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes des Hundes. I. Mitteilung: Säure- und Säure-Cystein-Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes. 457.

II. Mitteilung: Beiträge zur Kenntnis der Kinase-Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes. 485.

III. Mitteilung: Die Wirkung des Darmsaftes auf die Aktivierung der tryptischen Wirkung des Pankreassaftes. 509.

IV. Mitteilung: Die Wirkung der Gewebemazeration auf die Aktivierung des Pankreassaftes. 521.

KENDO, Kazuo. Über die Konstitution des Ophidins eines N-haltigen Extraktivstoffes der Schlangemuskel. 265.

KOBAYASHI, Tetu. Biochemical studies on carbohydrates. LXXXI. Chondrosin. Fourth Report: On so-called chondridin. 399.

Kohlehydrate. Über das Verhalten verschiedener — der Organe und Gewebe im Hungerzustand und während des Winterschlafs. 539.

Kryptoxanthin. Über die Verteilung des —s in pflanzlichen Geweben. 101, 263.

L

Leber. Über die Extraktivstoffe der — von Wassersalamandern im Winterschlafs. 85.

Leber. Über die Verwertung der Fettsäuren in der — und dem Muskel beim Hungern. 1.

Lezithinspaltenden Fermente. Über die — —. 113.

M

Malariaharn. Chemie des —s. 329.

MARUSHIMA, Yasushi. Chemie des Malariaharns. 329.

MARUSHIMA, Yasushi. Chemische Untersuchungen der Schwerlen (*Misgurnus Anguillicandatus* Cantor). 317.

MATUBARA, Kijiro. Über den Gehalt der Gewebe an verschiedenen ungesättigten Fettsäuren im Fett und Phosphatid bei Normal- sowie Fettwäit. 17.

MATUMOTO, Kenzi. Synthese der β -3- α -12-Dioxy-Allocholansäure und der β -3- α -12-Dioxy-Cholansäure. 173.

MATUMOTO, Kenzi. Über die Synthese der β -Allodisoxycholsäure aus Cholsäure. 183.

Meerschildkröt. Chemie der —n. 289, 301, 313.

Milchsäure. Über das Auftreten der — im Harn nach dem Kardiazolkrampf. 335.

MOTOMURA, Sizuka. Über den Einfluss des Carnosins und Ophidins auf die alkoholische Gärung. 283.

MOTOMURA, Sizuka. Über eine gärbeschleunigende Wirkung der Zahnpulpa. 277.

Muscle. Studies on the Pasteur reaction in —. 191.

Muskel. Über die Verwertung der Fettsäuren in der Leber und dem — beim Hungern. 1.

N

NAITO, Yoshinori. Biochemical studies on *d*-ribose, with special reference to the mechanism of absorption of sugars from intestinal tract. 131.

NAKAMURA, Sinji. Über die Spezifität der Arginase. 243.

NEGUCHI, Shunji. Über die lezithinspaltenden Fermente. 113.

O

OKASAKI, Yasuya. Über die Extraktivstoffe der Leber von Wassersalamandern (*Diemyctylus Pyrrhogaster*) im Winterschlaf. 85.

OKASAKI, Yasuya. Über die Gallensäuren von Wassersalamandern. I. Über die Gallensäure und Steroide in der Galle des Wassersalamanders. (*Diemyctylus Pyrrhogaster*). 65.

II. Über die Synthese von Homocholan $C_{25}H_{44}$ und Bismorsterocholan $C_{26}H_{46}$ und Isomocholan aus Tetraoxyisomocholan aus der Galle von Wassersalamandern. 77.

Ophidin. Über den Einfluss des Carnosins und —s auf die alkoholische Gärung. 283.

- Ophidin. Über die Konstitution des —, eines N-haltigen Extraktivstoffes der Schlangemuskel. 265.
- 3-Oxy- Δ^7 -Cholensäure. Über das Schicksal der — im Kaninchen- und Meerschweinchenorganismus. 55.
- OYAMADA, Yoshio. Der enzymatische Abbau der Histidins. 227.
- OYAMADA, Yoshio. Die Mikrobestimmungsmethode des Histidins in Harn. 43.
- Ozonabbau des Leprotein. Versuch zum — — —s. 535.

P

- Pankreassaft. Über die Aktivierung der tryptischen Wirkung des —es des Hundes. 457, 485, 509, 521.
- Pasteur reaction. Studies on the — in muscle. 191.
- Peptonspaltung. Über die katheptische. —. 427.
- Polysaccharide. On neutral — of glycoproteins. 395.
- Protease. Studies on —. 91.

R

- Reptilie. Über den respiratorischen Stoffwechsel bei Embryo der —n. 337.
- d*-Ribose. Biochemical studies on — with special reference to the mechanism of absorption of sugars from intestinal tract. 131.

S

- SAKAI, Tooru. Über die Gewebeproteolyse. II. Mit.: Über die ereptasefreie Katheptase-Wirkung und die katheptische Acyldipeptidase-Wirkung. 383.
- III. Mit.: Über die katheptische Peptonspaltung. 427.

- IV. Mit.: Unterscheidung der katheptischen Peptonase-wirkung von der Proteinase-wirkung. 443.
- Schlangemuskel. Über die Konstitution des Ophidins, eines N-haltigen Extraktionstoffes der —. 265.
- Schmerle. Chemische Untersuchungen der —n (*Misgurnus Anguillacandatus* Cantor). 317.
- SINKAI, Keisi. Über die Zuckerbilder der Haut bei normalen und pathologischen Stoffwechsel. 369.
- Steroide. Über die Gallensäure und — in der Galle des Wassersalamanders. 65.
- Stoffwechsel. Über den respiratorischen — beim Embryo der Reptilien. 337.
- SUGAI, Kikuo. Studies on protease. VI. The effect of the addition of various salts on the tryptic activity. 91.
- SUZUKI, Hiroshi. Biochemical studies on carbohydrates. LXXX. On neutral polysaccharides of glycoproteins. A supplementary note of the LIX and LXVI informations. 395.

T

- TAKEDA, Yoshiharu und Tetuo OHTA. Versuche zum Ozonabbau des Leproteins. 535.
- TAKEDA, Yoshiharu, Tatuo OHTA und Minoru SATO. Studien über das Endotoxin von *Salmonella* Typhi. I. Mit.: Die Isolierung der antigenen und hoch toxischen Substanz aus *Salmonella* typhi. 407.
- TAKEDA, Yoshiharu, Tatsuo OHTA und Yuseu SEN. Studien über das Endotoxin von *Bacillus Dysenteriae* Shiga. I. Mit.: Die Isolierung der toxischen und anti-

- gene Substanz von *Bacillus dysenteriae* Shiga. 419.
- TANAKA, Hiroshi. Chemie der Meeresschildkröten. I. Über die N-haltigen Extraktivstoffe der Muskeln von Meeresschildkröten. 289.
- II. Über die Fermente der Meeresschildkrötenorgane. 301.
- II. Chemische Untersuchungen des Harns von *Chelonia japonica* Thunb. 313.
- Tetraoxyisohomocholan. Über die Synthese von Homocholan $C_{25}H_{44}$ und Bishomocholan $C_{26}H_{46}$ und Isohomocholan aus — aus der Galle von Wassersalamandern. 77.
- TOMITA, Masaji und Tosio, TANAKA. Über den reparatorischen Stoffwechsel beim Embryo der Reptilien. 337.
- TOMITA, Masaji und Tosio, TANAKA. Verwirklichung der phytochemischen Reduktion von Trimethylaminoxid. 345.
- 3.7.12-Triketocholansäure. Über das Schicksal der 3.7-Dioxy-12-ketocholansäure sowie der — im Meerschweinchenorganismus. 163.
- Trimethylaminoxid. Verwirklichung der phytochemischen Reduktion von —. 345.
- Tryptic activity. The effect of the addition of various salts on the — —. 91.

Y

- YOSHIDA, Tatsuo. Über die im Tierkörper stattfindenden Veränderungen der an N substituierten Aminosäure. 9. Mit.: Über die Dimethylase. III. Ihre Eigenschaften und Komponenten. 355.
- YOSHIDA, Tatsuo und Senden FUKUYAMA. Über die im Tierkörper stattfinden Veränderungen der an N substituierten Aminosäuren. 8. Mit.: Über die Demethylase II. Ihre Verteilung. 349.

Z

- Zahnpulpa. Über eine gärbeschleunigende Wirkung der —. 277.
- Zuckerbilder der Haut. Über die — — — beim normalen und pathologischen Stoffwechsel. 369.

